

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

GEORGES BALASSA

PREMIÈRE THÈSE :

**ÉTUDE CINÉTIQUE DES SYNTHÈSES MACROMOLÉCULAIRES
AU COURS DU CYCLE SPORAL DE " BACILLUS SUBTILIS "**

DEUXIÈME THÈSE

(PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ) :

**MÉCANISME DE DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE
CHEZ LES MYXOMYCÈTES**

Soutenues le 19 octobre 1965 devant la Commission d'examen :

M. LWOFF, *Président*

MM. SLONIMSKI, SCHAEFFER, GROS, *Examineurs*

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

GEORGES BALASSA

PREMIÈRE THÈSE :

**ÉTUDE CINÉTIQUE DES SYNTHÈSES MACROMOLÉCULAIRES
AU COURS DU CYCLE SPORAL DE " BACILLUS SUBTILIS "**

DEUXIÈME THÈSE

(PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ) :

**MÉCANISME DE DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE
CHEZ LES MYXOMYCÈTES**

Soutenues le 19 octobre 1965 devant la Commission d'examen :

M. LWOFF, Président

MM. SLONIMSKI, SCHAEFFER, GROS, Examineurs



Janvier 1965

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

- PROFESSEURS -

Doyen M. ZAMANSKY

BRELOT	T Analyse supérieure.
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparée.
GRASSE	T Evolution des êtres organisés.
PREVOST	T Chimie organique.
WYART	T Minéralogie et Cristallographie.
TEISSIER	T Zoologie.
MANGENOT	T Biologie végétale (Orsay).
AUGER	T Physique quantique et Relativité.
MONNIER	T Physiologie générale.
PIVETEAU	T Paléontologie.
ROCARD	T Physique ENS.
CARTAN	T Mathématiques ENS.
LAFFITTE	T Chimie générale.
N...	T Géométrie supérieure.
COULOMB	T Physique du globe.
M ^{lle} COUSIN	T Biologie animale SPCN.
CHRETIEN	T Chimie minérale.
BOCQUET	T Zoologie.
KASTLER	T Physique ENS.
EPHRUSSI	T Génétique.
RIVIERE	T Géologie SPCN et Sédiment (Orsay).
GAUTHERET	T Biologie végétale PCB.
LUCAS (R.).	T Recherches physiques.
THOMAS (A.).	T Biologie cellulaire.
ARNULF	T Optique appliquée.
MORAND	T Physique enseignement.
SOLEILLET	T Physique PCB.
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides.
DRACH	T Zoologie.
QUENEY	T Météorologie et Dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T Embryologie.
EICHORN	T Botanique.
DE CUGNAC	T Biologie végétale SPCN.
M ^{lle} CAUCHOIS	T Chimique physique.
THELLIER	T Physique du globe.
L'HERITIER	T Biologie générale (Orsay).
GRIVET	T Radioélectricité (Orsay).
PONCIN	T Mécanique générale.
DU BREIL	T Arithmétique et Théorie des nombres.
QUELET	T Chimie organique.
CAGNIARD	T Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T Micropaléontologie.
JUNG	T Géologie.
TRILLAT	T Microscopie et Diffraction électronique.

WIEMANN	T Chimie organique et structurale.
JACQUINOT	T Spectroscopie et Physique céleste (Orsay).
VASSY	T Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES	T Théorie physique.
AMIEL	T Chimie générale.
HOCART	T Minéralogie et Cristallographie.
J.-P. MATHIEU	T Physique optique.
COUTEAUX	T Cytologie.
MAY	T Zoologie.
CHOQUET	T Théorie des fonctions et Topologie.
FELDMANN	T Biologie végétale marine.
GUINIER	T Physique des solides (Orsay).
JOST	T Physiologie comparée.
FORTET	T Calcul des probabilités et Physique mathématique.
SCHWARTZ	T Calcul différentiel et intégral.
CHOUARD	T Physiologie végétale.
MALAVARD	T Aviation (technique aéronautique).
NORMANT	T Synthèse organique.
BENARD	T Chimie minérale.
BUVAT	T Botanique ENS.
DUGUE	T Statistiques mathématiques.
SOULAIRAC	T Physiologie.
ULRICH	T Physiologie végétale appliquée.
MARECHAL	T Optique théorique et appliquée.
KIRRMANN	T Théories chimiques.
CHADEFAUD	T Botanique.
M ^{lle} Le BRETON	T Physiologie de la nutrition.
LELONG	T Application de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS	T Anatomie et Histologie comparée.
EHRESMAN	T Topologie algébrique.
FRANCON	T Physique SPCN.
GLANGEAUD	T Géographie physique et Géologie.
DODEMENT	T Mathématiques MGP.
PISOT	T Technique mathématique de la physique.
ROCH	T Géologie.
SCHATZMANN	T Astrophysique.
TERMIER	T Géologie générale.
ZAMANSKY	T Mathématiques générales.
LENNUIER	T Physique MGP.
RIZET	T Génétique (Orsay).
ROUTHIER	T Géologie appliquée.
M ^{me} TONNELAT	T Physique théorique.
DIXMIER	T Mathématiques MPC.
SOUCHAY	T Chimie générale.
AIGRAIN	T Electrotechnique générale.
BRUSSET	T Chimie systématique.
M. LEVY	T Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
M ^{me} CHAIX	T Chimie biologique.
M ^{me} HUREL PY	T Biologie végétale PCB.
PANNETIER	T Chimie générale.
BRUN	T Mécanique des fluides I.
LEDERER	T Chimie biologique (Orsay).

M ^{me} DUBREIL	T Mathématiques (Agrégation).
M ^{me} LELONG	T Mathématiques II ENS.
BELLAIR	T Géologie SPCN.
COTTE	T Physique électricité.
DUBOIS (J.-E.)	T Chimie organique.
LAMOTTE	T Zoologie ENS.
MICHEL (A.)	T Chimie minérale (Orsay).
OLMER	T Energétique générale.
ROUAULT	T Electricité (Orsay).
GAUTHIER	T Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ	T Chimie physique.
BROSSEL	T Physique atomique.
BUSER	T Physiologie comparée.
CAMUS	T Physiologie végétale.
CASTAING	T Physique II thermodynamique (Orsay).
CURIEN	T Minéralogie et Cristallographie.
MOYSE	T Physiologie végétale (Orsay).
M ^{me} CHARNIAUD-	
COTTON	T Evolution des êtres organisés.
POSSOMPES	T Zoologie.
PULLMANN	T Chimie quantique.
TEILLAC	T Physique nucléaire et Radioactivité (Orsay).
TONNELAT	T Biophysicochimie (Orsay).
VILLE	T Econométrie.
WILLEMART	T Chimie PCB.
DODE	T Chimie (Orsay).
FREYMANN	T Recherches physiques.
GUINOCHET	T Biologie végétale SPCN (Orsay).
ROLLET	T Chimie minérale.
M ^{lle} JOSIEN	T Chimie SPCN.
CHEVALLEY	T Géométrie algébrique et théorie des groupes.
ARNOULT	T Electronique (Orsay).
CHAPELLE	T Physique I (Orsay).
DELANGE	T Mathématiques I (Orsay).
DENY	T Mathématiques générales (Orsay).
GERMAIN	T Mécanique théorique des fluides.
LUCAS	T Géologie.
ALLARD	T Chimie physique.
BERTHELOT	T Physique des particules fondamentales (Orsay).
BRICARD	T Météorologie et Physique de l'atmosphère.
M ^{me} ALBE-FESSARD	T Psycho-physiologie.
FRIEDEL	T Physique des solides (Orsay).
JULIA (M.)	T Structures moléculaires complexes.
LENDER	T Biologie animale SPCN (Orsay).
MAGAT	T Physicochimie des radio-éléments.
M ^{lle} QUINTIN	T Electrochimie.
MONOD	T Chimie du métabolisme.
BENOIT	T Physiologie animale (Orsay).
DE POSEEL	T Analyse numérique.
CHARLOT	T Chimie analytique.
LEMEE	T Ecologie végétale (Orsay).
GUERIN	T Chimie MPC (Orsay).
CHATELET	T Chimie PCB.
JEAN	T Physique nucléaire (Orsay).

MATTLER	Physique SPCN.
BERGERARD	T Zoologie (Orsay).
BERTEIN	T Electronique (Orsay).
BOUISSIERES	T Radiochimie.
M ^{me} COUTURE	T Thermodynamique et mécanique physique.
ELLEMBERGER	T Géologie des grandes régions du globe (Orsay).
FRANC	T Biologie animale PCB.
SCHNELL	Botanique tropicale.
STLKOWSKI	T Physiologie végétale.
ACHER	T Chimie biologique.
BAUDOIN	T Biologie animale PCB.
BEAUMONT	Biologie animale SPCN.
BLAMONT	Géophysique ionosphère.
BOUREAU	T Botanique.
CURIE (D.)	Physique MGP.
DURAND DELGA	T Géologie.
FREON	T Chimie organique (Orsay).
HELLER	T Physiologie végétale.
TORTRAT	T Calcul des probabilités.
CAILLEUX	T Géologie SPCN.
MAGNAN	Physique électricité.
DAUDEL	T Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physiologie nucléaire.
M ^{lle} FOURCROY	Biologie végétale SPCN.
M ^{me} CHOQUET-	
BRUHAT	Mécanique analytique et mécanique céleste.
M ^{lle} VEIL	T Physiologie générale.
LWOFF	T Microbiologie.
SIESTRUNCK	T Mécanique physique et expérimentale.
LACOMBE	T Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay).
BROCHARD	T Physique PCB (Orsay).
CABANNES	T Mécanique générale.
LESIEUR	T Mathématiques I (Orsay).
MAZET	T Mécanique générale (Orsay).
CAIRE	Géographie physique et Géographie dyna- mique.
COMOLET	Mécanique des fluides.
CORABCEUF	T Physiologie animale (Orsay).
DELLOUE	T Physique de l'exosphère.
GORENFLOT	Botanique II (Orsay).
HOUILLO	Biologie animale PCB.
JULLIEN (J.)	Chimie SPCN (Orsay).
MALGRANGE	T Technique mathématique de la physique (Orsay).
OLIVIER	Anthropologie.
NOZERAN	T Botanique II (Orsay).
BLANC-LAPIERRE	T Physique ENS (Orsay).
CHEVAUGEON	T Botanique (Orsay).
KAHANE	T Mathématiques (Orsay).
SAMUEL	T Mathématiques ENS féminines.
KOURGANOFF	T Astronomie (Orsay).
THIRY	T Mécanique céleste.
ABELES	Physique SPCN.
AMAT	T Physique PCB.

AUBOIN	T Géologie.
M ^{me} BENOIT-	
GUEUTAL	T Physique nucléaire et Radioactivité (Orsay).
BOUGIS	Biologie marine (Villefranche-sur-Mer).
BRUHAT	T Mathématiques MPC.
BRUNN	T Géologie historique (Orsay).
CHABRAL	T Physique MGP (Orsay).
DEHEUVELS	T Mathématiques propédeutiques.
D'ESPAGNAT	T Physique théorique (Orsay).
FURON	T Géologie SPCN.
M ^{me} GANS	T Génétique.
GENEVES	Biologie végétale PCB.
GUILBERT	Physique CUS (Orléans).
HUPE	T Pétrographie.
HOLLANDE	T Biologie générale.
LIONS	T Analyse numérique.
MAITTE	T Chimie PCB.
MEYER	Physique propédeutique.
NICOLAS	Géologie appliquée.
PANIGEL	Biologie générale.
RAVIER	Pétrographie.
ROSEAU	T Mécanique théorique des fluides.
ROUBINE	Electronique.
SILBER	T Chimie PCB.
UEBERSFELD	T Electronique.
YVON	T Théories physiques.
HERVE	T Mathématiques.
NERON	T Mathématiques MPC (Orsay).
M ^{me} PECKER-	
WIMEL	T Astrophysique.
BALKANSKY	Physique MPC.
LE CORRE	T Electricité.
DELCROIX	T Physique théorique (Orsay).
GOURDIN	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
LEHMANN	T Physique expérimentale des hautes énergies.
NATAF	T Physique nucléaire et Radioactivité (Orsay).
ECHALIER	Biologie animale PCB.
BARRAUD	Physiologie cellulaire.
LIORET	Physiologie végétale (Orsay).
DARS	Géologie structurale et Géologie appliquée.
CAMEFORT	T Botanique (Agrégation).
VICHNIEWSKY	T Mécanique industrielle.
BLAQUIERE	T Electronique (Orsay).
ARNOUS	T Physique théorique.
TATIBOUET	Physique théorique.
MALLIAVIN	T Chimie (CSU, Orléans).
GAUDEMAR	Mathématiques propédeutiques (Orsay).
PEREZ Y JORBA	Physique expérimentale des hautes énergies (Orsay).
DAVID	T Chimie (Agrégation, Orsay).
BROUSSE	T Mécanique théorique.
ROSCH	T Astronomie.
GUY	T Physique expérimentale.

LAZARD	Mathématiques MPC.
MOREL (Pierre)	Physique MPC.
ARSAC	Programmation.
LEFEBVRE	Chimie MPC.
CHAPEVILLE	Biochimie.
BENOIT	Physique CPEM.
RIO	Chimie CPEM.
JAUZEIN	Géologie ENS.
PREVOST (Georges)	BV CPEM.
FAVARD (P.)	BA CPEM.
VILKAS	Chimie CPEM.
M ^{lle} FICINI	Chimie CPEM.
LEQUEUX	Astronomie.
COHEN TANNOUDJI	Physique MPC.
TAVERNIER	Physique CPEM.
M ^{me} ROIZEN	Physique CPEM.
DURAND (M.)	BA SPCN.
PASCAUD	Physiologie.
M ^{me} PETIT	BA CPEM.
BROUSSE	Géologie (Orsay).
CAGNIAC	Physique agrégation (Orsay).
LEBERRE	Zoologie (Orsay).
SCHEFFER	Microbiologie (Orsay).
DE GENNES	Physique des solides (Orsay).
RIOU	Physique nucléaire expérimentale (Orsay).
CLAUSER	Chimie biologique (Orsay).
CHEVALIER	Physiologie animale (Orsay).
JANCOVICI	Physique atomique (Orsay).
FALK-VAIRANT	Physique nucléaire (Orsay).
FETIZON	Chimie propédeutique (Orsay).
CERF	Mathématiques (Orsay).

Le Secrétaire général : R. POULAIN

Ce travail, entrepris sous l'impulsion de M. le Professeur P. Schaeffer, a été effectué dans le laboratoire de M. F. Gros. Les expériences sur la germination ont bénéficié de la collaboration de M. G. Contesse : l'étude cytologique est faite par M^{me} A. Ryter. Je remercie également MM. D. Hayes, S. Naono, C. Wilson, D. Schlessinger et R. Monier, qui m'ont apporté leur aide à des stades différents de ce travail. Un grand nombre d'expériences ont été réalisées avec l'assistance de M^{lle} A. Malhié.

La rédaction de ce travail a bénéficié des nombreuses critiques et suggestions de MM. Schaeffer, F. Gros et A. Kepes, je les en remercie bien vivement.

Enfin, j'aimerais exprimer ma reconnaissance à MM. les Professeurs A. Lwoff et P. Slonimski qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail et de participer au jury.

Owing to the scarcity of chemical data and to the complexity of life, and despite the progress of biochemistry, the biologist is still threatened with vertigo.

★ ★

If nature rarely forgives classification, she sometimes forgives theories.

A. LWOFF.

TABLE DES MATIÈRES

LES ACIDES RIBONUCLÉIQUES DE LA SPORE DE *B. subtilis*.

Ann. Inst. Pasteur, 1966, **110**, n° de janvier.

Introduction	5
Matériel et Méthodes	6
Résultats	7
1. Sédimentation des ARN	7
2. Les ARN solubles	9
Discussion	10
Références	12

SYNTHÈSES MACROMOLÉCULAIRES AU COURS DE LA GERMINATION DES SPORES DE *B. subtilis*. — I. CINÉTIQUE.

Ann. Inst. Pasteur, 1965, **109**, n° de novembre,

Introduction	13
Matériel et Méthodes	14
Résultats	16
A. Observations morphologiques	16
1. La phase initiale	16
2. La phase active	17
B. Synthèses macromoléculaires	18
1. Synthèse de l'ADN	19
2. Synthèse des ARN et des protéines	23
3. ARN stables et instables	26
Discussion	28
1. Relation entre événements morphologiques et biochimiques	28
2. Contrôle de la synthèse des ADN	30
3. Synthèse des trois types d'ARN	31
4. Stabilité des trois types d'ARN	32
Références	34

SYNTHÈSES MACROMOLÉCULAIRES AU COURS DE LA GERMINATION DES SPORES
DE *B. subtilis*. — II. RÉGULATION.

Ann. Inst. Pasteur, 1966, **110**, n° de janvier.

Introduction	36
Matériel et méthodes	36
Résultats	37
I. — Effet des acides aminés sur la germination	37
1. Germination dans les milieux synthétiques	37
2. Germination hétérogène des spores en absence des acides aminés	39
3. Synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines au cours de la germination en milieu synthétique	40
4. Synthèse des ARN après transfert en milieu pauvre (<i>shift- down</i>)	42
5. Effet de l'addition des acides aminés (<i>shift-up</i>)	43
6. Germination des spores obtenues en milieu synthétique ...	45
7. Absence de développement en milieu minimum	45
II. — Effet du chloramphénicol sur la synthèse des ARN....	45
1. Etudes en milieu complexe	45
2. Etudes en milieu synthétique	48
3. Réversion de l'effet du chloramphénicol	49
Discussion	52
1. Effet des acides aminés	52
2. Effet du chloramphénicol	53
3. Le rôle des ribosomes et des protéines ribosomales	55
Références	59

SYNTHÈSE ET FONCTION DES ARN MESSAGERS
AU COURS DE LA SPORULATION DE *Bacillus subtilis*.

Ann. Inst. Pasteur, 1966, **110**, n° de février.

Introduction	60
Matériel et Méthodes	61
Résultats	62
1. Cinétique de la sporulation	62
2. Synthèse des ARN messagers	64
3. Effet de l'actinomycine et du chloramphénicol sur l'appari- tion des spores résistantes	66
Discussion	72
Références	75

RENOUVELLEMENT DES ARN ET DES PROTÉINES
AU COURS DE LA SPORULATION DE *Bacillus subtilis*.

Ann. Inst. Pasteur, 1966, **110**, n° de mars.

Introduction	77
Matériel et Méthodes	78
Résultats	78
1. Vitesse de renouvellement des ARN et des protéines pendant la sporulation	78
2. Nature des ARN stables synthétisés pendant la sporulation	79
3. Stabilité des ARN en présence d'actinomycine	81
4. Dégradation des ARN ribosomiaux et accumulation des ARN solubles	82
5. Origine des ARN sporaux	85
6. Etude des mutants de sporulation	87
7. Renouvellement des ARN chez un mutant précoce	90
8. Effet du chloramphénicol et des acides aminés sur la synthèse des ARN	90
9. Classification des mutants selon le renouvellement des ARN	97
Discussion	99
1. Métabolisme des ARN	99
2. Vitesse de renouvellement des ARN	100
3. Régulation quantitative des synthèses macromoléculaires	101
a) Régulation par les acides aminés	101
b) Rôle d'une protéase dans la régulation	102
c) Effet du chloramphénicol	102
d) Coordination des réactions de synthèse et de dégradation	103
Références	106

LES ACIDES RIBONUCLÉIQUES DE LA SPORE DE *B. SUBTILIS*

par G. BALASSA.

(*Service de Physiologie Microbienne,
Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris*)

INTRODUCTION

Ayant pour but d'étudier les synthèses et dégradations d'acides nucléiques au cours de la germination et de la sporulation de *B. subtilis*, il nous a semblé nécessaire de procéder d'abord à l'étude des différents types d'ARN dans la spore mûre elle-même. Si en effet de nombreux travaux traitent de la composition des enveloppes sporales ou des enzymes cataboliques présents dans la spore (bibliographie dans Murrell, 1961 [7] et dans Halvorson, 1962 [5]), la composition en ARN de celle-ci a été relativement peu étudiée. L'intérêt de telles études vient du fait que, si la spore est métaboliquement inerte, elle est, lors de sa germination, rapidement capable de reprendre les synthèses macromoléculaires, protéiques en particulier. La question se pose donc de savoir si certains facteurs de la synthèse protéique sont présents dans la spore, et lesquels, et comment réapparaissent lors de la germination ceux qui en seraient absents.

On sait que, relativement aux formes végétatives, les spores sont pauvres en ARN (Fitz-James, 1955 [4]). Woese et coll. (1960 [9]) ont démontré, par centrifugation analytique, la présence dans les spores de ribosomes 50 S et 70 S, et l'absence de ribosomes 30 S et 100 S; ils ont observé également que la majorité des ARN de la spore est sous une forme non particulaire. L'analyse, par centrifugation préparative en gradient de saccharose, des extraits bruts de spores uniformément marquées à l'uracile- ^{14}C ou au ^{32}P , a également montré que la majorité des ARN sporaux sédimente, même en présence de magnésium à 10^{-2}M , à moins de 30 S (Balassa, 1963 [2]). Dans cet article nous étudierons plus précisément la nature de ces ARN.

Des analyses antérieures effectuées par centrifugation en gradient de saccharose des ARN purifiés (Balassa, 1963 [1]) nous ont amené à conclure que les ARN sporaux se composent d'ARN solubles (4 S),

d'ARN ribosomaux (16 S et 23 S), ne représentant qu'une faible fraction, et d'une importante fraction d'ARN polydispersés, distribuée autour de 8 S, et qui pouvaient représenter, disions-nous, soit « des précurseurs ou dérivés de l'ARN ribosomal », soit « une famille d'ARN messagers stables » (Balassa, 1963 [1]); des études ultérieures ayant d'ailleurs rendu la première interprétation plus probable (Balassa, 1963 [2]). Plus tard cependant, Doi et Igarashi (1964 [3]), utilisant une autre méthode d'extraction et analysant des ARN par chromatographie sur colonnes d'albumine méthylée, n'ont trouvé que des ARN de type ribosomal et soluble.

Ces résultats suggèrent que nos préparations ont été partiellement dégradées; nous avons donc décidé de réexaminer la nature des ARN sporaux.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

PRÉPARATION DES SPORES. — Le mutant Ind^-_{168} de la souche Marburg de *Bacillus subtilis* a été utilisé. Les cultures sporulées ont été obtenues en milieu complexe (Schaeffer et coll., 1963 [8]): pour 1 litre de milieu: bouillon nutritif Difco, 8 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g; KCl, 1 g; pH ajusté à 7,1-7,5. Après autoclavage, on ajoute $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ pour 10^{-2} M; MnCl_2 pour 10^{-5} M et FeSO_4 pour 10^{-6} M. Les spores sont traitées au lysozyme (Sigma, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en présence de versène 10^{-2} M, centrifugées, lavées trois fois à l'eau distillée, remises en suspension dans de l'eau physiologique, chauffées pendant une à trois heures à 60° et conservées à 4°C ou à -20°C . Pour éviter des contaminations éventuelles, les suspensions de spores sont chauffées à nouveau à 80° pendant dix minutes avant leur emploi. Plusieurs stocks de spores ont ainsi été préparés; ils ont été utilisés dans les trois mois.

SPORES RADIOACTIVES. — Pour obtenir des spores radioactives, de l'uracile- ^{14}C (0,5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 10 mCi/mM) ou du phosphate- ^{32}P (30 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) ont été ajoutés à des cultures en croissance exponentielle, pouvant encore effectuer au moins quatre doublements avant le début de la sporulation.

EXTRACTION DES ARN. — Des spores lavées, resuspendues dans du tampon acétate (acétate de sodium, 0,01 M; NaCl 0,1 M à pH 5,0) sont broyées mécaniquement. Un mélange de 20 ml de suspension de spores, en tampon acétate renfermant 0,5 p. 100 de duponol et 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de polysulfate de dextrane avec 10 ml de phénol à 90 p. 100, 2 ml de suspension à 2 p. 100 de bentonite activée et 30 g de billes de verre (diamètre 0,11-0,12 mm), est agité pendant trois minutes dans un appareil vibreur (B. Braun Apparatebau, Melsungen, Allemagne), en refroidissant par détente de CO_2 . Le broyat, additionné de 20 ml de phénol et de 10 ml de tampon acétate est agité énergiquement pendant quarante minutes à 2°C avant de recueillir la phase aqueuse par centrifugation. L'ARN est précipité deux fois par addition de deux volumes d'alcool à -20°C , dissous dans du tampon acétate, traité à la bentonite

activée (200 $\mu\text{g/ml}$), centrifugé de nouveau et enfin congelé. Certains extraits subissent, avant l'addition de la bentonite, un traitement par la DNase (Worthington, 10 $\mu\text{g/ml}$, en tampon tris 0,025 M à pH 7,0, en présence de MgSO_4 10^{-2} M, pendant une heure à 0°).

La méthode décrite ici est essentiellement celle que nous avons utilisée précédemment (Balassa, 1963 [4]), cependant des précautions supplémentaires sont prises pour éviter toute dégradation d'ARN. Outre l'addition de polysulfate de dextrane, il nous apparut important d'une part de refroidir très fortement la suspension au cours du broyage et d'autre part d'effectuer la purification des ARN très rapidement à partir de solutions pas trop concentrées, après une agitation très énergique en présence de phénol. La méthode de Doi et Igarashi (1964 [3]) diffère de la nôtre par le mode de broyage des spores et par la présence, en cours de broyage, de magnésium ($5 \cdot 10^{-2}$ M).

ANALYSE DES ARN. — Les ARN purifiés sont analysés par centrifugation en gradient de saccharose (5 à 20 p. 100, en tampon acétate). Les échantillons déposés sur le gradient sont centrifugés dix-huit heures à 22 500 t/min. dans un rotor Spinco SW 25. Après percée du fond des tubes, l'ARN total est mesuré dans les fractions recueillies par son absorption à 260 $\text{m}\mu$ et la radioactivité est mesurée après précipitation en TCA froid à 5 p. 100. Dans certaines expériences une partie de chaque fraction est traitée par la RNase (Worthington, 10 $\mu\text{g/ml}$, trente minutes à 37°).

L'ARN soluble est purifié comme décrit dans le texte, son activité acceptrice des acides aminés est mesurée d'après Monier (1962 [6]), à l'aide d'un surnageant d'un extrait frais de *B. subtilis* en croissance exponentielle.

RÉSULTATS

1° SÉDIMENTATION DES ARN. — Alors que la méthode d'extraction précédemment utilisée (Balassa, 1963 [4]) livrait des préparations d'ARN polydispersés, la technique améliorée décrite ci-dessus, conduit à des profils de sédimentation « classiques », montrant 3 pics correspondant aux ARN ribosomaux (23 S et 16 S) et solubles (4 S). De tels profils ont été obtenus après broyage, avec ou sans addition de bactéries entraînuses, de petites quantités de spores uniformément marquées au ^{32}P (fig. 1) ou à l'uracile- ^{14}C (fig. 2). La radioactivité de chaque fraction peut être entièrement solubilisée par la RNase : elle est bien incorporée dans des ARN. D'autres préparations d'ARN, provenant du broyage de quantités plus importantes de spores non radioactives et analysées par leur absorption à 260 $\text{m}\mu$, ont présenté des profils de sédimentation analogues (fig. 3). Il faut donc conclure que les ARN sporaux sont constitués, en majorité sinon en totalité, par des ARN ribosomaux et solubles.

D'après Doi et Igarashi (1964 [3]), la présence de magnésium en concentrations très élevées ($5 \cdot 10^{-2}$ M) est requise pendant le broyage des spores. Les préparations des figures 2 et 3 ont été obtenues en

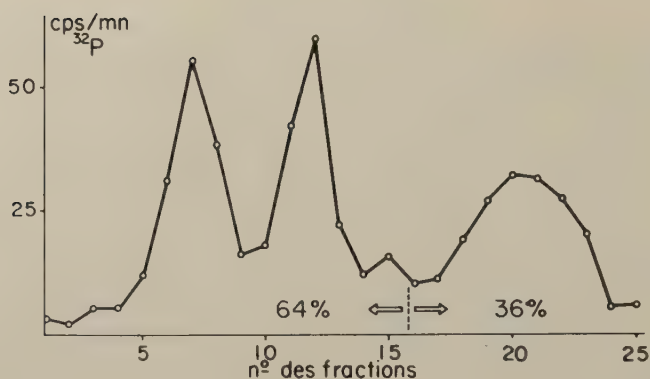


FIG. 1. — Profil de sédimentation des ARN des spores uniformément marquées au ^{32}P .

L'extraction des ARN et les conditions de centrifugation sont décrites dans le texte.

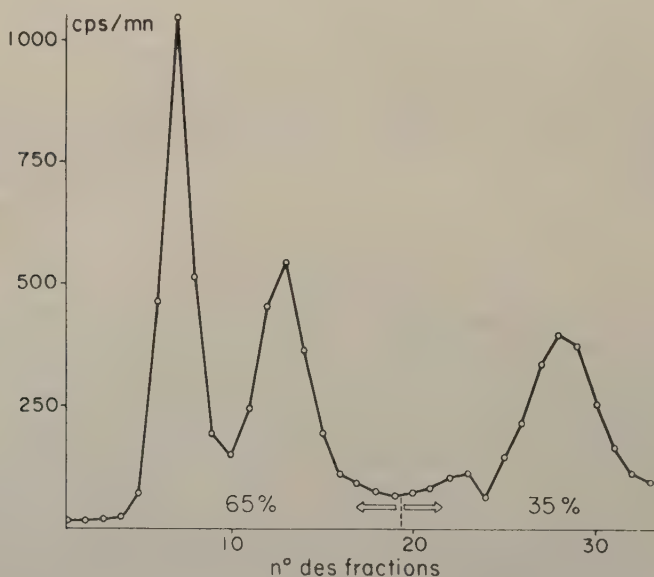


FIG. 2. — Profil de sédimentation des ARN des spores uniformément marquées à l'uracile- ^{14}C .

absence de magnésium, celle de la figure 1 en sa présence. D'autres expériences montrent également que, d'une façon générale, la présence de magnésium pendant le broyage ne change pas la sédimentation des ARN obtenus. Cependant, dans certaines expériences,

des ARN à profil de sédimentation « polydisperse », ou présentant un pic supplémentaire entre 6 et 12 S, ont été obtenus, alors que des ARN préparés parallèlement, mais après broyage en présence de $5 \cdot 10^{-2}$ M d'acétate de magnésium, ont montré un profil plus classique. Il semble donc que la présence de Mg peut empêcher la dégradation partielle des ARN sporaux, si ceux-ci ne sont pas suffisamment protégés pendant leur extraction.

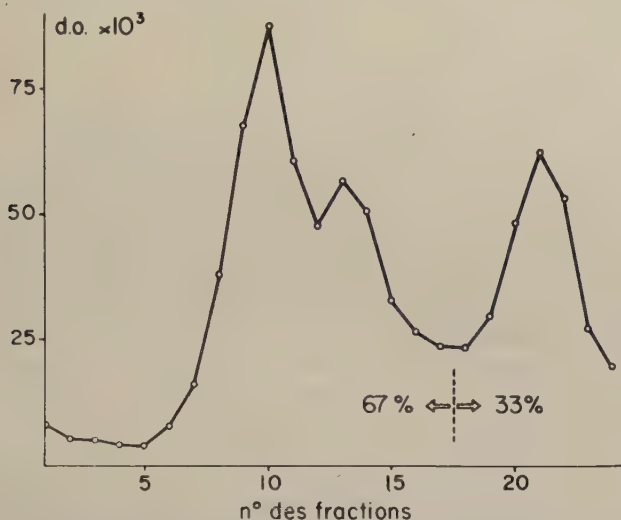


FIG. 3. — Profil de sédimentation des ARN des spores, mesuré par leur absorption à 260 m μ .

2° LES ARN SOLUBLES. — Dans les préparations d'ARN sporal que nous venons de décrire, environ 35 p. 100 des ARN se trouvent dans le pic 4 S correspondant aux ARN solubles (fig. 1-3). Même dans les préparations « polydisperses », la présence d'ARN solubles peut être mise en évidence, soit par précipitation en NaCl 1 M, soit par chromatographie sur colonne d'albumine méthylée (Balassa, 1963 [2] ; Doi et Igarashi, 1964 [3]). Pour identifier sans ambiguïté cette fraction aux ARN de transfert, un test fonctionnel a été effectué (dans le laboratoire de M. R. Monier).

Une préparation d'ARN a été obtenue par la méthode décrite. La présence dans l'extrait de spores d'une substance visqueuse, présumée muco-peptidique, et une dégradation partielle de cette préparation sont sans doute responsables du profil de sédimentation polydisperse et du faible rendement obtenus. La fraction, soluble dans du NaCl à 1 M, a été purifiée par chromatographie sur DEAE-cellulose (Monier, 1962 [6]).

Lorsque 300 μ g d'ARN solubles sporaux ont été incubés avec un hydrolysate de chlorelles marquées au ^{14}C et une préparation enzymatique provenant de *B. subtilis* en croissance, 1 800 cps/min. ont été comptés après précipitation à froid par le TCA à 5 p. 100. Le chiffre correspondant dans un témoin effectué avec des ARN solubles de bactéries végétatives était 3 900 cps/min. L'ARN soluble sporal possède donc au moins 40 p. 100 de l'activité de l'ARN soluble des bactéries; compte tenu de la dégradation observée, son activité initiale pourrait atteindre 100 p. 100.

DISCUSSION

Lorsque les ARN extraits de spores de *B. subtilis* sont analysés par centrifugation sur gradient de saccharose, les profils obtenus ne mettent en évidence que des ARN ayant des constantes de sédimentation de 4, 16 et 23 S. Lorsque des pics supplémentaires sont observés, ayant des constantes voisines de 8 S, ils sont dus à une dégradation partielle des ARN ribosomaux au cours de l'extraction; nous adoptons finalement sur ce point l'opinion de Doi et Igarashi (1964 [3]). Ces ARN, qui représentent 65 p. 100 du total, ont la même composition en bases que leurs homologues des bactéries végétatives (Doi et Igarashi, 1964 [3]); ils ne sont cependant pas associés, dans la spore, à des particules ribosomales normales (Woese, 1960 [9]), et peut-être faut-il voir là la cause de leur particulière sensibilité à la dégradation. Un commentaire s'impose sur le comportement, décrit précédemment, des préparations partiellement dégradées sur colonnes d'albumine méthylée (Balassa, 1963 [2]). Alors que la centrifugation montrait un maximum vers 8 S, la majorité des ARN d'une telle préparation n'était éluee, en deux pics, qu'autour de l'ARN ribosomal 16 S. Ce comportement anormal s'explique par l'attachement, en haute concentration de sel, des ARN partiellement dégradés aux ARN ribosomaux normaux, provenant de bactéries végétatives ajoutées avant l'extraction (Hayes, communication personnelle).

35 p. 100 des ARN sont représentés par des ARN de transfert, caractérisés par leur solubilité en NaCl 1 M, leur constante de sédimentation, leur comportement sur colonne d'albumine méthylée et leur activité biologique. Cette proportion, très voisine de celle trouvée par Doi et Igarashi [3] (30 p. 100), est deux fois plus élevée que chez les bactéries végétatives; nous reviendrons, dans un article consacré à la sporulation, sur le mécanisme de cet enrichissement.

Enfin, ni les profils de sédimentation des préparations non dégradées d'ARN sporal, ni les essais d'hybridation de cet ARN avec l'ADN bactérien dénaturé ne mettent en évidence l'existence d'une fraction de type messenger (Doi et Igarashi, 1963 [3]; Balassa, 1963 [2]).

RÉSUMÉ

Les résultats concernant la nature des ARN présents dans la spore dépendant de la méthode d'extraction, plusieurs méthodes ont été comparées. On arrive aux conclusions suivantes :

1° 35 p. 100 des ARN des spores sont, tant par leurs caractéristiques physiques (4 S) que par leur fonction, des ARN de transfert (le chiffre correspondant pour les bactéries est 17 p. 100).

2° Les ARN ribosomaux (16 S et 23 S) constituent 65 p. 100 de l'ARN des spores ; alors que, dans les formes végétatives, ils sont en totalité associés aux ribosomes, quelque 5 p. 100 d'entre eux seulement sont ainsi associés dans la spore. L'autre fraction, présente sous forme non particulaire, est très sensible à la dégradation.

3° Ni les profils de sédimentation, ni les tests « d'hybridation » ne mettent en évidence d'ARN de type messenger.

SUMMARY

THE RIBONUCLEIC ACIDS OF THE SPORE.

Since the observations made on the nature of the ribonucleic acids of the spore depend on the method of extraction used, several methods have been compared. The following conclusions have been reached :

1. 35 % of the sporal RNA, as judged by physical characteristics (4 S) and function, is transfer RNA (the corresponding figure for bacteria is 17 %).

2. Ribosomal RNA (16 S and 23 S) constitutes 65 % of the sporal RNA. While in the vegetative form all of the ribosomal RNA is present in ribosomes, in the spore only about 5 % of the ribosomal RNA exists in this form, the remaining being present in a non-particulate form, highly sensitive to degradation.

3. The presence of an RNA of messenger type has not been revealed by sedimentation analysis or by hybridation tests.

*
* *

Ce travail a bénéficié des conseils de MM. D. Hayes et R. Monier ainsi que des critiques et suggestions de MM. P. Schaeffer et F. Gros.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BALASSA (G.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, **72**, 497.
 - [2] BALASSA (G.). Dans *Mécanismes de régulation chez les microorganismes*. Colloque du C. N. R. S., 1963, Ed. C. N. R. S., 1965, p. 565.
 - [3] DOI (R. H.) and IGARASHI (R. T.). *J. Bact.*, 1964, **87**, 323.
 - [4] FITZ-JAMES (P. C.). *Can. J. Microbiol.*, 1955, **1**, 502.
 - [5] HALVORSON (H. O.). In *The Bacteria*, Ed. GUNSALUS (I. C.) and STANIER (R. Y.), Acad. Press New York, 1962, **44**, 223.
 - [6] MONIER (R.). *Bull. Soc. Chimie biol.*, 1962, **44**, 109.
 - [7] MURRELL (W. G.). *Symp. Soc. gen. Microbiol.*, 1961, **11**, 100.
 - [3] SCHAEFFER (P.), IONESCO (H.), RYTER (A.) et BALASSA (G.). Dans *Mécanismes de régulation chez les microorganismes*, 124^e Colloque du C. N. R. S., 1963, Ed. C. N. R. S., 1965, p. 553.
 - [9] WOESE (C. R.), LANGRIDGE (R.) and MOROWITZ (H. J.). *J. Bact.*, 1960, **79**, 777.
-

SYNTHÈSES MACROMOLÉCULAIRES AU COURS DE LA GERMINATION DES SPORES DE *B. SUBTILIS*

I. — CINÉTIQUE

par G. BALASSA et G. CONTESSE

(Service de Physiologie Microbienne, Institut de Biologie
Physico-Chimique, Paris.)

INTRODUCTION

Il est classique de distinguer deux phases dans les transformations que subissent les spores bactériennes lors de leur germination. La première, à laquelle certains réservent le nom de « *germination* » (O'Brien et Campbell, 1957 [32]), d'autres celui de « *initiation of germination* » (Murrell, 1961 [30]), sera ici appelée « PHASE INITIALE » (Hermier, 1962 [15]). La seconde, qui seule s'accompagne de synthèses macromoléculaires, nous l'appellerons « PHASE ACTIVE », c'est l'« *out-growth* » des Anglo-saxons.

Au cours de la phase initiale très courte, les spores perdent leurs propriétés caractéristiques : thermorésistance, réfringence, imperméabilité aux colorants, et elles libèrent dans le milieu plusieurs constituants sporaux (voir par exemple les revues de Murrell, 1961 [30], et de Levinson et Hyatt, 1963 [25]). Cette phase a ses exigences spécifiques, différentes de celles de la croissance, et variables avec l'espèce (Hills, 1950 [17]). Elle peut se dérouler dans des conditions qui ne permettent pas la croissance, par exemple en présence de chloramphénicol (Kosaki, 1959 [23]). Aboutissant à la modification de la perméabilité des spores et probablement à l'activation d'un système enzymatique fournisseur d'énergie, elle rend possible la phase active de la germination. Dans ce travail, nous nous contenterons de décrire les changements morphologiques qui l'accompagnent.

Au cours de la phase active, plus longue et moins étudiée, les synthèses macromoléculaires reprennent graduellement jusqu'à l'établissement de la croissance équilibrée, caractéristique du milieu employé. Pendant cette phase, les spores se gonflent, l'enveloppe sporale se rompt, les bactéries en émergent, s'allongent et enfin se divisent.

Dans cet article, nous étudierons parallèlement, au cours de la phase active de la germination, le développement morphologique et la cinétique des synthèses macromoléculaires, en insistant sur les facteurs intervenant dans le contrôle de la synthèse de l'ADN. Dans un article ultérieur, nous étudierons les mécanismes de régulation qui déterminent les vitesses de synthèse des ARN et des protéines. En effet, les spores en germination constituent, croyons-nous, un matériel particulièrement favorable à l'étude de ces régulations. Des résultats préliminaires ont déjà été publiés (Balassa, 1963 [4]).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

PRÉPARATION DES SPORES. — Le mutant Ind^{-168} (requérant l'indole) de la souche Marburg de *Bacillus subtilis* est utilisé. La préparation et la purification des spores ont été décrites dans l'article précédent (Balassa, p. 5 et [3]).

MILIEUX DE GERMINATION. — Le milieu nutritif déjà décrit pour la préparation des spores est utilisé avec les modifications suivantes : omission du fer et du calcium et addition de glucose (0,5 p. 100). Pour les expériences comportant un marquage au phosphate radioactif, un milieu appauvri en phosphates est préparé comme suit : une solution concentrée, contenant 8 p. 100 de bouillon nutritif Difco et 0,1 p. 100 de KCl (pH 7,0-7,2), est traitée par un excès d'acétate de baryum 1 M, jusqu'à coloration rouge avec l'acide rhodiyonique. Après centrifugation des phosphates précipités, le surnageant reçoit du MgSO_4 pour 10^{-3} M et du MnCl_2 pour 10^{-5} M, puis est porté à ébullition. Le précipité formé est éliminé et le milieu obtenu, dilué dix fois, est stérilisé et additionné de glucose.

GERMINATION DES SPORES. — Des suspensions concentrées de spores sont diluées au temps zéro dans un milieu prééquilibré à 37° pour une densité optique initiale de 0,2 à 1,0 (mesurée à 420 m μ au spectrophotomètre de Zeiss). Au cours de l'incubation de ces cultures agitées, la densité optique est suivie sur des prélèvements immédiatement fixés à la formaldéhyde (3 p. 100), les mesures ayant lieu plus tard (les densités optiques ainsi mesurées sont sous-estimées, car si la formaldéhyde arrête la croissance, elle ne supprime pas entièrement la baisse de densité optique qui se produit au cours de la phase initiale). Dans le milieu utilisé, la croissance se produit jusqu'à une densité optique finale de 5,0.

L'actinomycine (Merck, Dohme et C^o) et le chloramphénicol (Hoffman-Laroche) sont utilisés à la concentration finale de 100 $\mu\text{g/ml}$.

MÉTHODES CYTOLOGIQUES. — Ces méthodes ont été décrites en détail ailleurs (Ryter, 1965 [36]). Nous en rappellerons brièvement les principes :

a) *Microscopie optique.* La vitesse et le synchronisme de la germination ont été estimés dans chaque expérience par examen au microscope

à contraste de phase, en suivant la disparition des spores réfringentes puis l'émergence des bactéries. Les lots de spores avec lesquels la phase initiale ne se faisait que tardivement ou incomplètement ont été éliminés. Malgré cela, dans la plupart des expériences, la phase initiale a été plus lente et moins synchrone que dans les descriptions publiées. L'origine de cette difficulté n'est pas connue.

b) *Coloration des noyaux*. Une goutte de culture, étalée sur une lame, est exposée aux vapeurs d'acide osmique pendant trois minutes. Les lames sont séchées et colorées par la méthode de Piéchaud (1959 [34]).

c) *Microscopie électronique*. Les bactéries sont observées soit par la technique de contraste négatif de Brenner et Horne (1959 [4]), soit en coupes minces, après fixation à l'acide osmique et inclusion au Vestopal, par la technique de Ryter et Kellenberger (1958 [38, 39]).

DOSAGES CHIMIQUES. — Les échantillons de 25 ml, prélevés pour les dosages d'ARN et d'ADN, sont additionnés d'azoture de sodium (10^{-2} M), refroidis et centrifugés. Le culot obtenu est lavé deux fois à l'eau distillée, puis resuspendu dans de l'acide trichloracétique (TCA) à 5 p. 100 et incubé à 90° pendant trente minutes. Après centrifugation, l'ARN et l'ADN sont dosés dans le surnageant par les méthodes de Meijbaum (1953 [29]) et de Burton (1956 [6]) respectivement. De l'ARN de levure (Nutritional Biochemical Corporation) ou de l'ADN de thymus de veau ont servi de référence dans le dosage. Les résultats sont exprimés en μ g d'acide nucléique par millilitre de culture. Il a été vérifié que ni les spores ni les bactéries ne contiennent de substances perturbant le dosage des acides nucléiques purifiés.

INCORPORATION DES PRÉCURSEURS RADIOACTIFS. — Les produits radioactifs utilisés proviennent du Commissariat à l'Energie Atomique : uracile-2- 14 C, 24 mCi/mmole ; DL-valine-carboxyl- 14 C, 3 mCi/mmole ; adénine-8- 14 C, 10 mCi/mmole et 32 PO $_4^{--}$ sans entraîneur. L'uracile et l'adénine sont ajoutés généralement pour 1 μ Ci/ml ; des échantillons de 0,5 ml sont prélevés dans du TCA à 5 p. 100 froid, filtrés et lavés sur millipore et comptés dans un compteur Tracerlab à fenêtre mince. La valine est ajoutée à 0,5 μ Ci/ml ; les prélèvements, dilués dans du TCA à 5 p. 100 contenant 0,5 p. 100 de valine, sont traités à 90° pendant dix minutes, puis filtrés et comptés comme ci-dessus.

Il a été vérifié à plusieurs reprises que l'uracile est incorporé exclusivement dans l'ARN : le matériel radioactif est insoluble dans le TCA à 5 p. 100 froid ; il devient entièrement soluble à 90°, ou après incubation dans NaOH 1 M à 37° ; dans les extraits, il est sensible à la RNase. La valine est incorporée principalement dans les protéines, puisque son incorporation est inhibée par le chloramphénicol.

Le phosphate radioactif est ajouté pour 200 μ Ci/ml dans le milieu appauvri en phosphates. Les prélèvements de culture de 0,5 ml sont pipetés dans du TCA à 5 p. 100 froid. Après addition de quelques gouttes d'albumine de sérum à 0,1 p. 100 pour l'entraîner, le précipité est centrifugé et lavé deux fois au TCA à 5 p. 100. Les acides nucléiques sont extraits et séparés par la méthode de Schmidt et Tannhauser (1945 [41]), suivant Fitz-James (1955 [41]) : le précipité est resuspendu dans 1 ml de NaOH 1 M, mis à incuber pendant une nuit à 37°,

neutralisé par du HCl concentré, acidifié en ajoutant 0,1 ml de TCA à 50 p. 100, puis centrifugé. Le surnageant contient la radioactivité provenant de l'ARN. Le culot, après avoir été lavé au TCA à 5 p. 100 froid, est resuspendu dans 1 ml de TCA à 5 p. 100, mis à incuber à 90° pendant trente minutes, puis centrifugé. Ce deuxième surnageant contient la radioactivité de l'ADN ; 0,05 ml de chaque surnageant est étalé sur des planchettes en aluminium et leur radioactivité est mesurée. Cette méthode a déjà été appliquée avec succès à l'étude des acides nucléiques de la spore pendant la germination (Fitz-James, 1955 [42]) et sa spécificité pour les acides nucléiques en question vérifiée. L'adsorption non spécifique des précurseurs radioactifs n'a été soustraite que dans le cas du ^{32}P .

RÉSULTATS

A. — OBSERVATIONS MORPHOLOGIQUES (1)

Le développement morphologique des spores de diverses espèces de *Bacillus* au cours de la germination a été étudié au microscope optique par de nombreux auteurs (revue par Robinow, 1960 [35]). Cet auteur observe que, chez *B. subtilis* (germant dans un milieu non précisé), l'émergence des bactéries se fait à 100 min. et que les bâtonnets de morphologie normale apparaissent vers 180-200 min. Plus récemment, le microscope électronique a permis une description plus détaillée de la germination, d'abord par l'observation des bactéries entières (Knaysi et Hillier, 1949 [21]), puis par celle des coupes minces de *B. megaterium* (Mayall et Robinow, 1957 [28] ; Chapman et Zworkin, 1957 [7]), ou de *B. subtilis* (Brieger, 1963 [5] ; Kawata et coll., 1963 [49]).

Les observations morphologiques qui suivent ont été faites dans les mêmes conditions, et le plus souvent dans les mêmes expériences, que les mesures biochimiques.

1° LA PHASE INITIALE. — Au microscope à contraste de phase, on observe que les spores ayant perdu leur réfringence apparaissent à 5 min. et représentent la totalité de la population à 15 min. La densité optique diminue dès le début pour atteindre un minimum vers 30 min. Les colorations nucléaires, faites pendant cette phase de la germination, permettent de déceler un noyau central unique. Les observations faites sur coupes minces, concordent en tous points avec celles déjà décrites (Mayall et Robinow, 1957 [28]) ; Kawata et coll., 1963 [49] ; Brieger, 1963 [5]) : le cortex devient spongieux ou lamellaire, le cytoplasme perd son aspect diffus et acquiert la structure granulaire caractéristique de la phase végétative, tandis que le noyau, initialement périphérique, devient central. La connec-

(1) Effectuées par M^{me} A. Ryter (Institut Pasteur).

tion du noyau avec un mésosome bien développé, relié à la membrane sporale, est facilement visible (Ryter et Jacob, 1964 [37]). La paroi est apparente sans l'aide de coloration (pl., fig. 1).

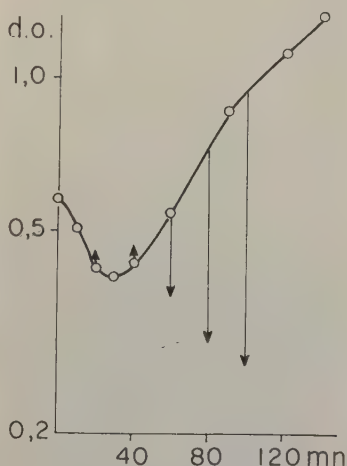
Le chloramphénicol, ajouté au milieu de germination avant l'ensemencement par les spores, ne supprime ni la diminution de la densité optique, ni les transformations morphologiques décrites ci-dessus (pl., fig. 2).

2° LA PHASE ACTIVE. — a) *Observation au microscope optique.* Le microscope à contraste de phase permet d'observer directement le gonflement des spores qui commence immédiatement après la phase initiale, ainsi que l'émergence des bactéries vers la soixantième minute, puis leur élongation, et enfin leur division. La coloration nucléaire montre des germes à deux noyaux à partir de 60 min. (pl., fig. 5, 7). Des bactéries à 3 ou 4 noyaux commencent à apparaître vers 90 à 100 min. (pl., fig. 8). Tous ces événements de la phase active sont totalement inhibés par le chloramphénicol (pl., fig. 3) et par l'actinomycine.

Des bactéries en phase végétative se lysent facilement par le lysozyme, tandis que les spores mûres, protégées par les tuniques, y résistent entièrement. La figure 1 montre que l'action lytique du

FIG. 1. — Action du lysozyme pendant la germination.

A différents temps de germination, 20 $\mu\text{g/ml}$ de lysozyme sont ajoutés. Les flèches représentent les changements de densité optique intervenus après 20 min. d'incubation en présence de lysozyme.



lysozyme ne se manifeste que tardivement, lors de l'émergence de la paroi bactérienne. La protection par les tuniques continue donc bien après la perte de la thermorésistance. Rappelons à ce sujet qu'au cours de la sporulation la résistance au lysozyme et la thermorésistance apparaissent simultanément (Schaeffer et coll., 1963 [40]).

b) *Observation au microscope électronique.* Sur coupes minces, la phase active se caractérise par la dissolution du cortex, l'augmentation en volume du cytoplasme sporal, le développement de la paroi sporale en paroi bactérienne (Ryter, 1965 [36]), puis la rupture des tuniques et l'élongation de la bactérie (pl., fig. 4). La formation du premier septum de division a été suivie sur des bactéries entières observées en contraste négatif; elle a lieu vers 80-90 min., soit bien après la première division nucléaire.

En conclusion, nos observations cytologiques confirment celles des auteurs cités; elles précisent, en outre, le déroulement des événements observés et les situent dans le temps par rapport aux événements biochimiques qui nous restent à décrire.

B. — SYNTHÈSES MACROMOLÉCULAIRES

Les études biochimiques de la germination ont généralement porté sur la respiration et les voies métaboliques de l'utilisation du glucose (voir p. ex. Levinson et Hyatt, 1963 [25]; Halvorson, 1963 [14]; Goldman et Blumenthal, 1964 [13]). Toutefois, si l'augmen-

LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Coupe de spore en germination depuis 10 min. On distingue les tuniques (T), le cortex (C) devenu spongieux et la paroi sporale (P.S.). Le cytoplasme et le noyau (N) offrent tous deux un aspect normal de cellule en croissance. Un mésosome (M) est visible dans le voisinage du noyau.

Gr. 50 000 $\times$.

FIG. 2. — Spore après 10 min. de germination en présence de chloramphénicol. L'aspect est identique à celui de la spore précédente.

FIG. 3. — Spore après 90 min. de germination en présence de chloramphénicol. L'évolution de la germination a été arrêtée. Le cortex a presque entièrement disparu, tandis que le cytoplasme et le noyau se sont éclaircis.

FIG. 4. — Cellule végétative d'une spore après 120 min. de germination. Les tuniques sporales sont encore visibles. Le premier septum de division est en formation, tandis que les noyaux effectuent leur seconde division.

FIG. 5. — Coloration nucléaire de spore à 30 min. de germination. La spore n'a toujours qu'un seul noyau.

Gr. 5 000 $\times$.

FIG. 6. — Coloration nucléaire de spore à 45 min. de germination. Le noyau unique est très visible.

FIG. 7 a et b. — Germination normale à 90 min. La plupart des cellules contiennent deux noyaux.

FIG. 8. — Germination normale à 120 min. Les bactéries, relativement longues, contiennent de deux à quatre noyaux.

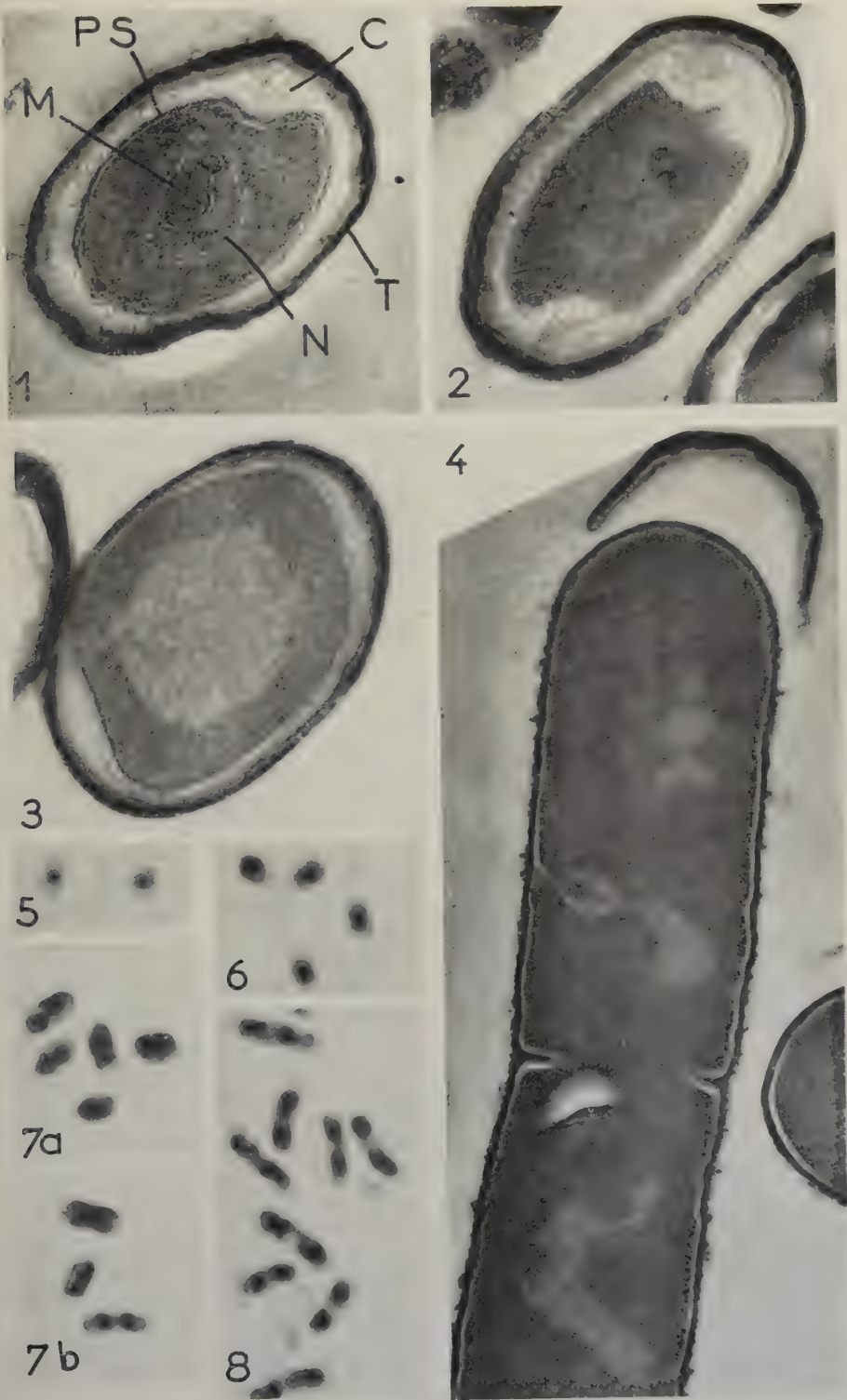


PLANCHE I.

tation de la vitesse de respiration reflète sans doute en partie des synthèses protéiques, elle n'en permet pas la mesure.

La synthèse des acides nucléiques au cours de la germination a été étudiée en détail par Fitz-James (1955 [42]) chez *B. megaterium*. La synthèse des ARN commence très tôt ; celle de l'ADN seulement après un long temps de latence. Les relations existant dans le temps entre la synthèse de l'ADN et la division nucléaire (mise en évidence par coloration de bactéries dont la germination est suffisamment synchrone) ont aussi été étudiées par cet auteur. Woese et Forro (1960 [45]) ont mesuré l'incorporation du ^{32}P dans les acides nucléiques au cours de la germination de *B. subtilis* : leurs résultats confirment ceux de Fitz-James, et établissent en outre que 85 p. 100 de l'ARN sporal est soumis à un renouvellement pendant la germination.

Nous avons, par des dosages chimiques et par des études d'incorporation de précurseurs radioactifs, réétudié au cours du temps les synthèses d'ADN, d'ARN et de protéines dans nos conditions de germination.

1^o SYNTHÈSE DE L'ADN. — D'après le dosage colorimétrique (fig. 2), aucune synthèse nette décelable de l'ADN n'a lieu pendant le début de la phase active. L'augmentation de la quantité d'ADN commence

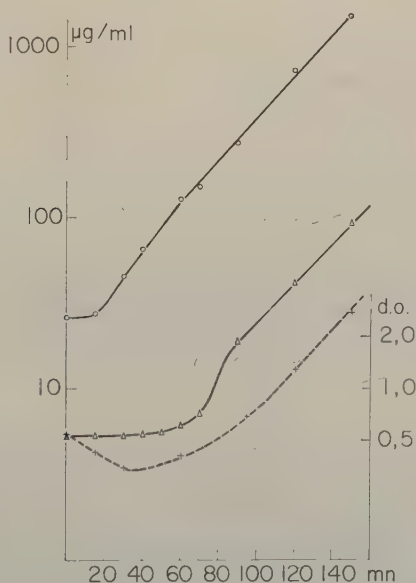


FIG. 2. — Synthèse de l'ADN et des ARN au cours de la germination. Les ARN (○) et l'ADN (▽) sont dosés colorimétriquement. + = densité optique.

vers 40 min., ensuite le taux de synthèse augmente rapidement, passe, vers 70 min., par un maximum, et atteint sa valeur finale vers 80 min.

L'incorporation du ^{32}P dans l'ADN permet de suivre plus précisément la cinétique de cette synthèse (fig. 3 et 4). Aucune incorporation n'est observée avant la trentième minute; il y a donc un long temps de latence absolue. Entre 30 et 50 min., la vitesse d'incorporation augmente rapidement, ensuite la synthèse de l'ADN semble demeurer linéaire jusqu'à 60 min. Ce n'est qu'entre 60 et 80 min. (à un temps difficile à déterminer exactement) que la synthèse de l'ADN devient exponentielle.

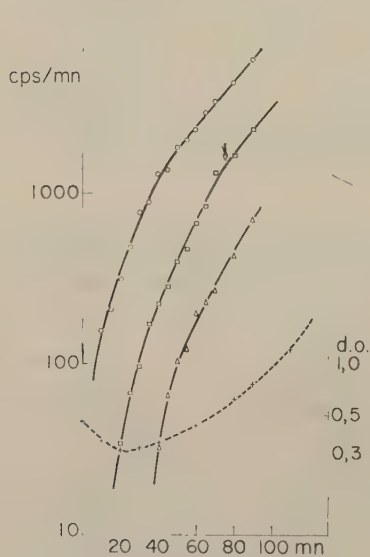


FIG. 3 a.

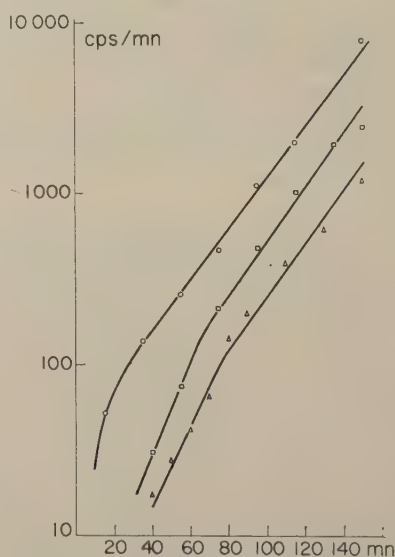


FIG. 3 b.

FIG. 3. — Synthèses macromoléculaires au cours de la germination.

La synthèse de l'ADN (Δ) est suivie, dans deux expériences, par l'incorporation de ^{32}P , celle des ARN (O) par l'incorporation de l'uracile- ^{14}C (fig. a) ou de ^{32}P (fig. b), enfin la synthèse des protéines ($\square$) est mesurée par l'incorporation de la valine- ^{14}C .

L'identité des résultats obtenus par voie chimique et par incorporation de ^{32}P , jointe au fait que l'incorporation du ^{32}P dans les ARN s'observe dès le début de la phase active, montre que la latence initiale observée pour le marquage de l'ADN n'est pas un artefact dû à la mauvaise pénétration du phosphate dans les cellules ou à une dilution du marqueur radioactif par des précurseurs endogènes.

Pour déterminer le rôle de la synthèse protéique dans le déclenchement de la synthèse de l'ADN, nous avons aussi, par incorporation de ^{32}P , suivi la synthèse de l'ADN en présence de chloramphénicol (fig. 5). Ajouté avant, ou au début de la phase active, cet antibiotique inhibe complètement la synthèse de l'ADN. Lorsqu'il est ajouté après le début de cette synthèse, par contre, l'incorporation se poursuit normalement pendant trente minutes puis s'arrête tota-

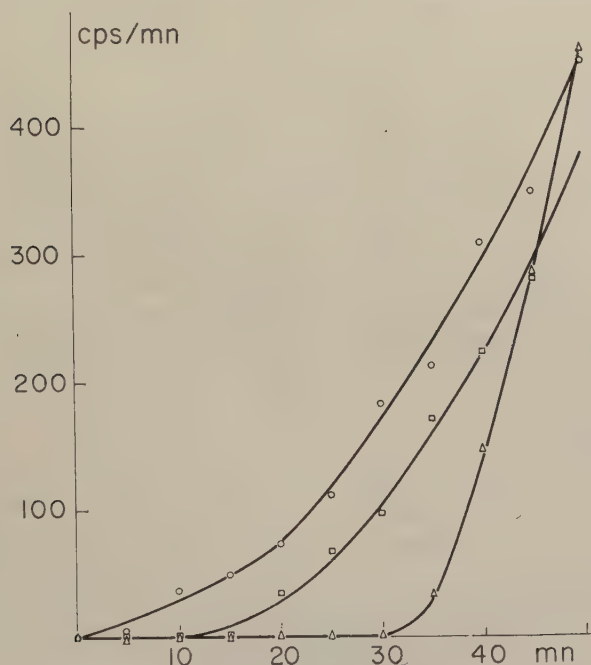


FIG. 4. — Synthèse des macromolécules au début de la phase active. Après avoir introduit un facteur de correction arbitraire pour rendre les trois courbes comparables, les résultats de la figure 3a sont reportés ici en coordonnées linéaires.

lement. Si l'on admet que la vitesse de synthèse de l'ADN pendant un cycle de réplication est constante, cette vitesse est une mesure du nombre des bactéries engagées dans un cycle de réplication, tandis que la radioactivité incorporée en présence de chloramphénicol mesure la quantité d'ADN qui reste à synthétiser pour terminer le cycle commencé. Le rapport de ces deux valeurs doit être constant dans une culture non synchronisée. Le tableau I montre les rapports obtenus dans l'expérience décrite ci-dessus ;

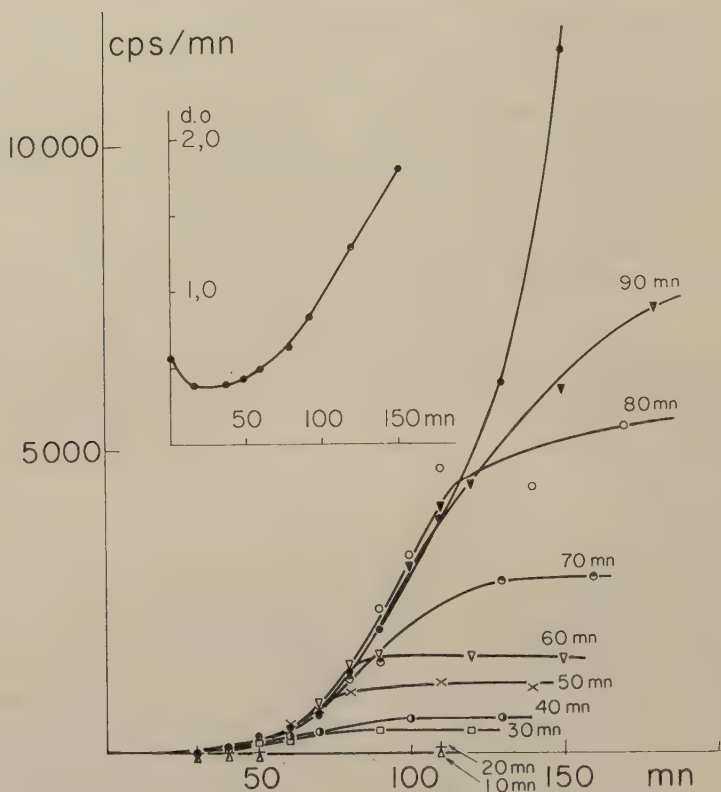


FIG. 5. — Synthèse d'ADN en présence de chloramphénicol.

Le ^{32}P est ajouté au début de la germination. Aux temps indiqués, du chloramphénicol est ajouté et l'incorporation du ^{32}P dans l'ADN est mesurée (● = culture témoin).

TABLEAU I. — Synthèse de l'ADN en présence de chloramphénicol.

Temps d'addition du chloramphénicol..	30	40	50	60	70	80	90
Rapport Δ/τ	2,8	2,0	3,4	3,0	2,6	3,3	3,0

Les chiffres obtenus à partir des résultats de la figure 5, représentent le rapport de la quantité totale de ^{32}P incorporée dans l'ADN en présence de chloramphénicol (Δ) au taux de synthèse de l'ADN au moment de l'addition de l'antibiotique (τ). Ce dernier est obtenu (d'une façon approximative) en mesurant l'incorporation du ^{32}P dans la culture témoin pendant les dix minutes qui précèdent et les dix minutes qui suivent le moment de l'addition du chloramphénicol.

les variations périodiques observées indiquent (malgré l'imprécision des mesures du taux de synthèse) un synchronisme partiel de la réplication de l'ADN, du moins pendant la première division.

2° SYNTHÈSE DES ARN ET DES PROTÉINES. — Mesurée par dosage colorimétrique, la synthèse des ARN commence très tôt, et son taux d'accroissement exponentiel final s'établit rapidement, entre 20 et 40 min. (fig. 2). Si l'on mesure l'incorporation de ^{32}P , d'uracile- ^{14}C ou d'adénine- ^{14}C , aucune période de latence n'est observée : l'incorporation, très faible au départ, s'accélère d'une façon qui est, au plus tard à partir de 20 à 40 min., autocatalytique (fig. 3 et 4).

L'incorporation de la valine- ^{14}C dans les protéines ne peut être mise en évidence qu'après une période d'environ 10 min. La cinétique d'incorporation (après avoir introduit un facteur de correction arbitraire pour rendre comparables les courbes relatives aux ARN et aux protéines) a la même allure initiale que celle de l'uracile, mais elle est en retard de 10 min.

Une mesure plus précise des taux de synthèse des ARN et des protéines peut être fournie par la détermination des vitesses d'incorporation des précurseurs, ajoutés à différents temps de la germination. La figure 6 montre que l'incorporation reste linéaire pendant

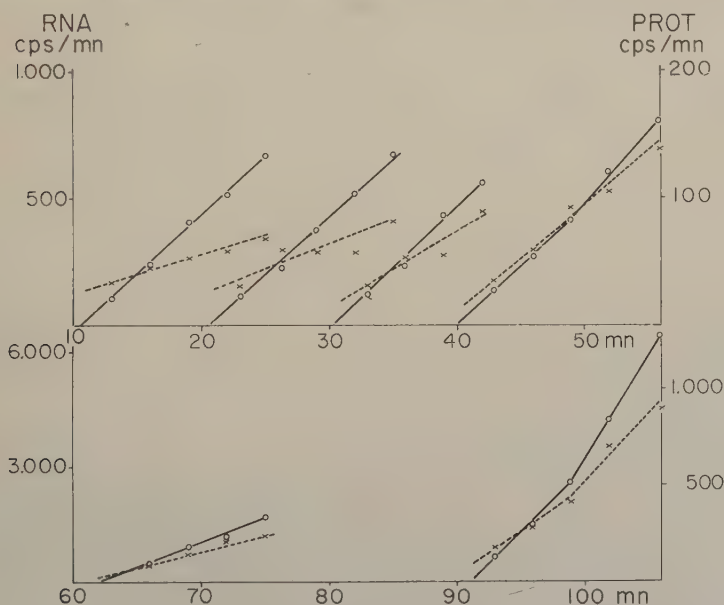


FIG. 6. — Synthèse des ARN et des protéines au cours de la germination. De l'uracile- ^{14}C (O) et de la valine ^{14}C (x) sont ajoutés à différents temps de germination et leur incorporation est mesurée. Les vitesses d'incorporation ainsi déterminées sont reportées sur le tableau II (Exp. 1).

au moins vingt minutes, les courbes d'incorporation s'extrapolent toujours très près du moment de l'addition des produits marqués : on n'observe jamais de retard significatif (de plus d'une minute) dans l'incorporation. Ceci permet de déterminer graphiquement la vitesse d'incorporation pour chaque temps d'addition de précurseur radioactif. Les valeurs obtenues dans des expériences de ce type figurent au tableau II. On y voit que la vitesse de synthèse des ARN, mesurée par l'incorporation d'uracile- ^{14}C est constante ou n'augmente que très lentement jusque vers la trentième minute ; elle augmente ensuite de plus en plus rapidement. Quant à la valine- ^{14}C , son taux d'incorporation s'accroît graduellement dès le début de la germination. Par conséquent, le rapport des taux de synthèse ARN/protéine diminue progressivement au début de la germination, avant de devenir constant vers 60 min.

TABLEAU II. — Synthèse des ARN et des protéines au cours de la germination en milieu complexe.

<i>Expérience 1 :</i>	10	20	30	40	60	90	120 mn	
ARN	45	46	46	51	137	440	5600	
PROT	2,5	4,1	5,4	8,3	17,5	61	1570	
ARN/PROT	18	11	8,6	6,1	7,8	7,2	3,5	
<i>Expérience 2 :</i>	20	30	45	60	90	120	150 mn	
ARN	30	44	63	63	244	2800	680	
PROT	3,8	4,9	9,3	16,6	63	153	180	
ARN/PROT	7,9	8,9	6,8	3,8	3,8	18	4,3	
<i>Expérience 3 :</i>	15	20	30	45	60	90	120 mn	
ARN	32	33	41	56	71	203	605	
PROT	2	4,4	6,4	11	19	53	183	
ARN/PROT	16	7,6	6,4	5,1	3,8	3,8	3,3	
<i>Expérience 4 :</i>	5	15	30	45	60	90	120	160 mn
ARN ur. \...	16	20	22	33	49	158	333	1080
ARN ad. ...	18	39	104	174	262	710	2040	6300
PROT	1,1	2,4	3,4	8	12,1	36,5	109	478
ARN								
ur /PROT	15	8,3	6,4	4,1	4	4,3	3,0	2,2
ARN								
ad /PROT	16,5	16	31	22	21	20	19	13

Germination en milieu complexe. Aux temps indiqués, de l'uracile- ^{14}C (1 $\mu\text{Ci/ml}$, act. spéc. 24) et de la valine ^{14}C (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, act. spéc. 3) ont été ajoutés et des prélèvements ont été faits. Les chiffres représentent les taux d'incorporation initiaux, mesurés pendant les quinze minutes qui suivent l'addition des précurseurs radioactifs et exprimés en cps/mn incorporés par minute par prélèvement ; ils ont été déterminés graphiquement sur les courbes d'incorporation. Dans l'expérience n° 4, le milieu de germination contenait dès le début $5 \cdot 10^{-5}$ M d'uracile et de valine ; l'incorporation de l'adénine- ^{14}C (1 $\mu\text{Ci/ml}$, act. spéc. 10) a été également mesurée. A partir de quatre-vingt-dix minutes les mesures ont été faites dans une culture diluée cinq fois.

Pour vérifier que le simple fait d'ajouter de l'uracile ou de la valine n'affecte pas la vitesse d'incorporation, ces substances ont été ajoutées séparément dès le début de la germination (tableau II, expérience 4); les cinétiques d'incorporation obtenues dans ces conditions ne différaient pas des cinétiques précédentes.

Considérant maintenant la valeur du rapport ARN/ADN, déterminée par des dosages colorimétriques, on voit qu'il augmente au cours de la germination, passant en 100 min. de la valeur initiale 5,2, caractéristique des spores, à la valeur 16,5, caractéristique de la croissance exponentielle dans le milieu utilisé.

L'interprétation des mesures effectuées requiert quelques commentaires. Tout d'abord, il faut signaler les deux faits suivants, qui restent inexpliqués : 1° des augmentations brusques, mais de courte durée, de la vitesse d'incorporation de l'uracile ont plusieurs fois été notées dans nos expériences vers 120 min., dans celles de Vinter (1965 [43]) plus précocement ; 2° l'adénine- ^{14}C , contrairement à l'uracile- ^{14}C , s'incorpore à une vitesse immédiatement croissante (tableau II, exp. 4).

Pour que nos résultats cinétiques traduisent l'augmentation des taux de synthèse dans les spores en phase active, il faudrait, *en théorie*, que la phase initiale fût synchrone. En pratique, la germination tardive d'une fraction même importante des spores ne doit pas perturber sérieusement les résultats concernant les ARN et les protéines, puisque l'accélération rapide des synthèses fait jouer un rôle prépondérant aux spores le plus précocement germées. En théorie également, les cinétiques d'incorporation de précurseurs radioactifs pourraient dépendre de variations dans la valeur de facteurs tels que la perméabilité des spores germantes, la vitesse avec laquelle se renouvellent les macromolécules initialement présentes dans les spores, ou la compétition entre précurseurs endogènes et exogènes. Si ces facteurs jouaient un rôle quantitativement important, la signification de nos courbes en serait faussée. Tel ne semble pas être le cas, comme le montre la concordance des résultats obtenus par deux méthodes différentes ou, dans le cas des ARN, par l'emploi de trois précurseurs marqués différents. En particulier, la linéarité de l'incorporation des précurseurs, quel que soit le temps de leur addition, montre bien que si un pool de précurseurs intracellulaires existe, il est très rapidement équilibré avec les précurseurs exogènes.

Pour toutes ces raisons nous croyons donc à la validité des conclusions suivantes : la synthèse des ARN commence dès le début de la phase active. Elle prend au plus tard vers la 20°-40° min. une cinétique d'allure autocatalytique. La synthèse des protéines commence 10-20 min. après celle des ARN, mais augmente ensuite plus rapidement que celle-ci.

3° ARN STABLES ET INSTABLES. — Les expériences précédentes illustrent les variations au cours du temps des ARN *totaux* synthétisés, sans en distinguer les différents types (messagers, ribosomaux et solubles). Levinthal et coll. (1962 [26]) ont montré qu'il est possible d'utiliser l'actinomycine D pour mesurer à la fois la quantité et la stabilité métabolique des ARN messagers de *B. subtilis* prélevé en croissance exponentielle. Nous avons donc étudié en

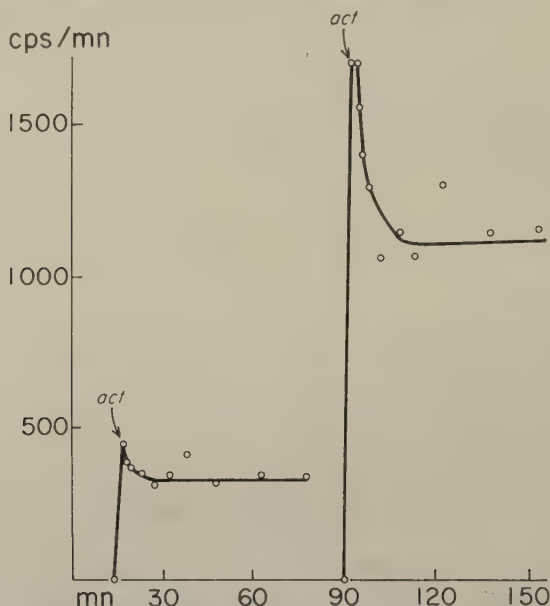


FIG. 7. — Dégradation des ARN rapidement marqués au cours de la germination.

De l'uracile- ^{14}C est ajouté à des spores à quinze minutes et à quatre-vingt-dix minutes de germination. L'actinomycine est ajoutée trois minutes plus tard et la radioactivité de la fraction acido-insoluble est mesurée.

présence d'actinomycine les ARN synthétisés au cours de la germination des spores. L'antibiotique était ajouté après un marquage de 3 min. par de l'uracile- ^{14}C ; ensuite, la radioactivité encore présente dans la fraction acido-insoluble était mesurée à des temps variables. Les courbes obtenues (fig. 7) ne se distinguent pas de celles obtenues par Levinthal et coll. (1962 [26]) avec des bactéries en croissance, ou par nous-même (Balassa, 1963 [2]) avec des bactéries en cours de sporulation : toutes indiquent la présence, et dans les mêmes proportions, d'ARN messagers instables ayant une demi-vie de 1 à 2 min.

La stabilité au cours de la germination de l'ARN initialement présent dans la spore a aussi été étudiée par la même méthode. Des

spores uniformément marquées à l'uracile- ^{14}C , mises au temps zéro dans le milieu de germination, reçoivent de l'actinomycine à différents temps. A tous les temps une dégradation rapide d'une petite fraction (10 p. 100) de l'ARN a été observée (fig. 8). Une interprétation de ces résultats sera présentée dans la discussion.

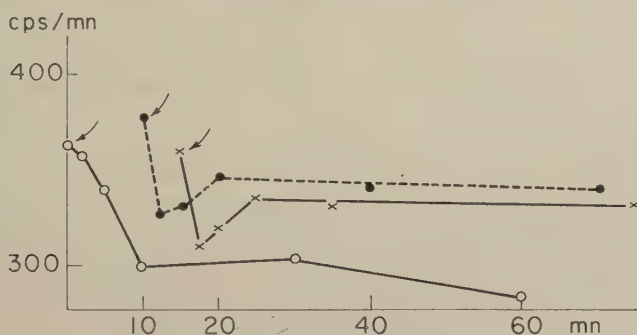


FIG. 8. — *Stabilité des ARN sporaux.*

Au cours de la germination de spores uniformément marquées à l'uracile- ^{14}C , de l'actinomycine est ajoutée (flèches) à zéro minute (○), dix minutes (●) et quinze minutes (x) de germination, et la radioactivité acido-insoluble est mesurée.

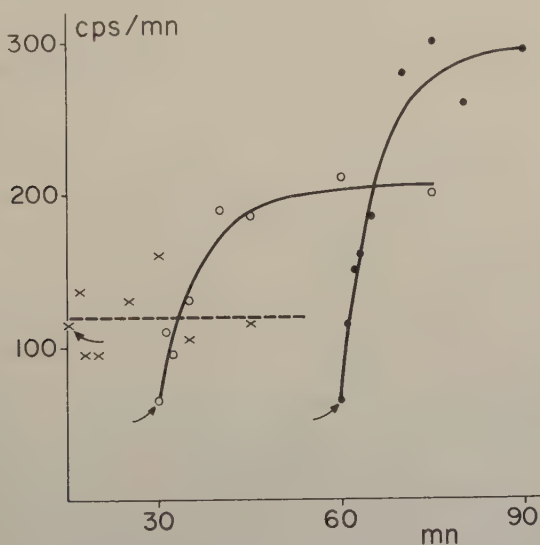


FIG. 9. — *Synthèse des protéines en présence d'actinomycine.*

De la valine- ^{14}C et de l'actinomycine sont ajoutées simultanément à quinze minutes (x), trente minutes (○) et soixante minutes (●) de germination (temps indiqués par les flèches). L'incorporation de la valine dans la fraction acido-insoluble est mesurée.

Enfin, la présence dans la spore d'ARN messagers stables, capables donc de provoquer une synthèse continue de protéines, a été recherchée en mesurant, en présence d'actinomycine ajoutée à temps variable, l'incorporation de la valine- ^{14}C ajoutée en même temps. Si l'actinomycine est ajoutée au temps zéro, aucune synthèse protéique n'a lieu : il n'y a pas d'ARN messenger stable décelable dans la spore. Par contre, si l'actinomycine est ajoutée plus tard (fig. 9), l'incorporation de la valine- ^{14}C ne s'arrête qu'après quelques minutes. On ne décèle pas d'incorporation résiduelle attribuable à la présence d'ARN messagers stables ; les courbes sont donc semblables à celles obtenues avec des bactéries en croissance. Cependant, la quantité totale de valine incorporée en présence d'actinomycine augmente avec le temps écoulé avant l'addition de l'antibiotique, ce qui traduit un enrichissement en ARN messagers des spores en cours de germination.

DISCUSSION

La séquence des événements morphologiques et biochimiques dont l'ensemble constitue la germination des spores (telle qu'on l'observe en milieu complexe et à 37°) est représentée au tableau III.

En raison sans doute du synchronisme imparfait de la germination observé dès la phase initiale, les temps, correspondant aux événements décrits, ont varié d'une expérience à l'autre ; pour chaque événement, nous avons choisi et rapporté dans le tableau III son temps d'apparition le plus précoce.

Nous discuterons des relations existant entre événements morphologiques et biochimiques au cours de la germination, du contrôle de la synthèse de l'ADN et enfin du renouvellement des ARN pendant cette période. La discussion des cinétiques décrites dans cet article est en partie renvoyée à l'article suivant, qui traitera des mécanismes de régulation intervenant dans les synthèses d'ARN et de protéines.

1° RELATION ENTRE ÉVÉNEMENTS MORPHOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES

La plupart des événements morphologiques de la phase active (gonflement des spores, émergence et élongation des bacilles) ne correspondent pas à des changements brusques dans la nature des synthèses macromoléculaires, mais plutôt à l'augmentation progressive et continue de la masse cytoplasmique (ARN et protéines).

La question des rapports pouvant exister entre synthèse d'ADN et division cellulaire est intéressante à étudier dans des spores germinantes, où cette synthèse est, à 40 min., brutalement déclenchée.

L'apparition de bactéries à deux noyaux, vers 60 min., correspond à la fin de la première duplication de l'ADN. A ce moment, on

TABLEAU III. — Cinétique de la germination (en milieu complexe).

TEMPS (mn)	MORPHOLOGIE	SYNTHÈSES		
		ADN	ARN	Protéines
0 - 5	Phase initiale	—	—	—
1 - 5			Début de la synthèse	
10	Gonflement			Début de la synthèse
20			Synthèse exponentielle	
40		Déclenchement du 1 ^{er} cycle synthèse linéaire		Synthèse exponentielle
60	Émergence 1 ^{re} division nucléaire	1 ^{er} doublement synthèse		
80 - 90	Élongation 2 ^e division nucléaire Formation des septa	2 ^e doublement		
Après 90	Division cellulaire normale	Croissance équilibrée		

n'observe aucun signe visible de division cellulaire : les septa n'apparaissent que vers 80 min., soit une dizaine de minutes avant l'apparition de bactéries à trois ou quatre noyaux. Au cours de la germination, le premier septum ne se forme donc que pendant, ou juste après le *deuxième* cycle de réplication de l'ADN, ce qui permet le retour à l'état binucléé normal, caractéristique des bacilles en croissance. Le modèle du réplicon (Jacob et coll., 1963 [18]), introduit la nécessité des relations périodiques entre des événements intéressant la membrane cytoplasmique d'une part, le déclenchement d'un cycle de réplication de l'ADN d'autre part.

Si l'on admet que le mécanisme de la duplication de l'ADN est le même pendant la germination et pendant la croissance, l'observation précédente montre au contraire qu'aucun « signal » membranaire n'est requis (au moins sous la forme d'une ébauche de septum visible au microscope électronique) pour déclencher cette duplication, qui, dans ses rapports nécessaires avec la formation d'un septum, apparaît plutôt comme étant l'événement primaire.

2° CONTRÔLE DE LA SYNTHÈSE DES ADN

Les faits relatés, concernant la synthèse d'ADN au cours de la germination, seront discutés en fonction des connaissances actuelles sur la biosynthèse de l'ADN et la duplication des structures génétiques, connaissances que nous résumons tout d'abord :

a) Les enzymes nécessaires à la synthèse de l'ADN sont multiples ; ils englobent les enzymes responsables de la synthèse des triphosphates de désoxyribonucléotides et l'ADN-polymérase (Kornberg, 1961 [22]) ; ils seront, pour les besoins de l'exposition, désignés collectivement ci-dessous du nom d'« ensemble enzymatique ».

b) La duplication du chromosome de *B. subtilis* est polarisée et commence en un point déterminé appelé origine (Sueoka et Yoshikawa, 1963 [42]) ; celle-ci est la même dans la spore germinente et dans la bactérie végétative (Wake, 1964 [44] ; Oishi et coll., 1965 [33]).

c) Le déclenchement d'un cycle de duplication de l'ADN requiert une synthèse préalable de protéines (Maaløe et Hanawalt, 1961 [27] ; Lark et Lark, 1964 [24]), mais de telles synthèses ne sont pas nécessaires pour que se termine une duplication déclenchée.

d) L'étude génétique de la réplication des épisomes conduit à la notion d'unités de réplication, ou réplicons (Jacob et coll., 1963 [18]) ; ce modèle fait également intervenir des « protéines initiateuses » de la duplication de l'ADN.

Ces connaissances permettent l'interprétation suivante des faits ici rapportés. Le taux d'emblée élevé de la synthèse d'ADN à 40 min. traduirait la présence dans la spore germinente d'un « ensemble enzymatique » fonctionnel. Remarquons que la présence de plusieurs enzymes de cet ensemble a effectivement été mise en évidence dans la spore elle-même (Falaschi et coll., 1965 [9]). La latence initiale de cette synthèse, que prolonge l'addition précoce de chloramphénicol, traduirait l'absence dans la spore germinente de « la » protéine initiateuse, la synthèse limitée en présence de l'antibiotique ajouté plus tardivement traduisant le fait que, la protéine initiateuse étant synthétisée, les duplications déclenchées peuvent s'achever en absence de synthèses protéiques. Nos observations s'intègrent donc aisément dans le cadre des connaissances actuelles et reviennent, pour l'essentiel, à suggérer que la protéine initiateuse, absente de la spore, est synthétisée vers 30 min., cette synthèse permettant celle de l'ADN.

La germination, au cours de laquelle la croissance passe d'un taux initial nul à un taux final, imposé (à une température donnée) par le milieu, présente des analogies avec un cas extrême de transfert de bactéries d'un milieu pauvre à un milieu riche. Un tel transfert,

on le sait (bibliographie dans Kjeldgaard, 1963 [20], et dans Neidhart, 1964 [31]), est suivi d'une augmentation rapide du rapport ARN/ADN, qui se fixe ensuite à sa nouvelle valeur d'équilibre. Cet ajustement s'effectue par une accélération de la synthèse des ARN plus précoce et plus brutale que celle de la synthèse des ADN. Au cours de la germination, le rapport ARN/ADN suit une évolution comparable, puisqu'il augmente initialement alors que la synthèse de l'ADN est bloquée, et se stabilise lorsque celle-ci reprend. L'apparition de la protéine initiatrice joue donc un rôle déterminant dans la fixation du rapport ARN/ADN à sa valeur d'équilibre.

3° SYNTHÈSE DES TROIS TYPES D'ARN

Dès le début de la phase active, des ARN stables et des ARN instables sont synthétisés. Les rapports des taux de synthèse de ces deux fractions, ainsi que les vitesses de dégradation des ARN messagers, sont les mêmes pendant la germination que pendant la croissance (ces conclusions sont aussi celles de Higa, 1964 [16]) ; leur constance est apparemment une règle générale, puisqu'on la retrouve chez les bactéries végétatives, quel que soit leur taux de croissance (Fan et coll., 1964 [10]), et chez les bactéries en sporulation (Balassa, 1963 [1, 2]).

L'étude de l'incorporation de la valine- ^{14}C en présence d'actinomycine montre que les ARN messagers sont absents de la spore et apparaissent au cours de la germination. Ici encore, nos conclusions rejoignent celles de Higa (1964 [16]), qui observe une stricte proportionnalité entre la vitesse de synthèse des ARN totaux, la quantité d'ARN messagers présents et la capacité des bactéries à synthétiser des protéines en présence d'actinomycine.

Quant aux ARN stables, solubles et ribosomaux, leur rapport varie au cours du cycle sporal, la proportion des ARN solubles étant de 35 p. 100 dans les spores, et de 17 p. 100 dans les bactéries en croissance exponentielle en milieu complexe (Doi et Igarashi, 1964 [8] ; Balassa, 1965 [3]). Dans un travail antérieur (Balassa, 1963 [1]), nous avons étudié, par centrifugation en gradient de saccharose, l'incorporation de l'uracile- ^{14}C dans ces ARN. Malgré les difficultés inhérentes à l'extraction des ARN des spores (difficultés qui ont été discutées ailleurs, Balassa, p. 5 et [3]), nous avons conclu que les ARN solubles et ribosomaux sont synthétisés au cours de la germination, dans les mêmes proportions que pendant la croissance et la sporulation ; les rapports des vitesses de synthèse des trois types d'ARN sont constants tout au long du cycle sporal. La diminution de rapport ARN soluble/ARN total, observée lors de la germination, doit donc être attribuée principalement à la dilution des ARN d'origine sporale dans les ARN néoformés.

4° STABILITÉ DES TROIS TYPES D'ARN

D'après Woese et Forro (1960 [45]) et d'après Higa (1964 [16]), la plus grande partie des ARN de la spore serait dégradée au cours de la germination, les produits de dégradation étant entièrement réutilisés. Dans notre travail cependant, lorsque de l'actinomycine est ajoutée en cours de germination, on observe que, quel que soit le temps de cette addition, la fraction de l'ARN qui se dégrade ne dépasse pas 10 p. 100 environ.

Au cours de l'étude de la sporulation (Balassa, page 60) nous avons fait l'hypothèse d'une autorégulation de la dégradation des ARN ribosomaux : la dégradation lente de ces ARN, observée dans certaines conditions, serait inhibée par l'accumulation des produits de dégradation et ne se ferait donc pas en présence d'actinomycine ; cette régulation ne s'appliquerait pas aux ARN messagers. Cette hypothèse permet aussi l'interprétation des faits observés au cours de la germination. Nous avons vu que 60 p. 100 des ARN des spores sont constitués par des ARN de type ribosomal (16 S et 23 S) présents cependant sous une forme non particulière (Balassa, 1966 [3]) ; cette fraction subit au cours de la germination une dégradation progressive et étendue, les produits de dégradation étant aussitôt réutilisés pour la resynthèse, dans les proportions habituelles, des trois types d'ARN. En présence d'actinomycine, au contraire, la dégradation des ARN ribosomaux de la spore serait rapidement arrêtée, et la dégradation que l'on observe serait principalement celle de l'ARN messager, formé antérieurement aux dépens des ARN ribosomaux de la spore et donc marqué comme eux.

RÉSUMÉ

Dans la germination des spores, une courte phase initiale précède la phase active, aboutissant à la reprise de la multiplication exponentielle. Des études cinétiques, effectuées en milieu complexe, montrent que :

1° La synthèse des ARN commence avec la phase active et prend rapidement une allure exponentielle ; celle des protéines suit une cinétique analogue, mais retardée d'environ 10 min.

2° Les proportions dans lesquelles les trois types d'ARN (messager, ribosomaux et de transfert) sont formés d'une part, la demi-vie des ARN messagers d'autre part, sont les mêmes pendant la germination que pendant la croissance. Le test fonctionnel confirme l'absence d'ARN messagers dans la spore.

3° La synthèse d'ADN n'est déclenchée que 30 à 40 min. après le début de la germination et se produit d'emblée à un taux élevé.

Ajouté avant le début de la synthèse d'ADN, le chloramphénicol supprime celle-ci ; ajouté après, il permet une synthèse résiduelle d'autant plus importante que son addition aura été plus tardive. Les études cinétiques suggèrent que la synthèse d'ADN dépend de celle, préalable, d'une protéine dite initiatrice et que celle-ci est absente de la spore.

4° Dans les conditions normales de croissance, la duplication de l'ADN est corrélative de la formation d'un septum de division. Lors de la germination, la première duplication de l'ADN s'effectue en l'absence de toute modification décelable de la membrane cytoplasmique : la corrélation ci-dessus mentionnée n'est donc pas nécessaire.

SUMMARY

SYNTHESIS OF MACROMOLECULES DURING GERMINATION.

I. — KINETICS.

During the germination of spores a short initial phase precedes the active phase which leads to the renewal of exponential multiplication. Kinetics studies carried out in complex medium have shown that :

1. RNA synthesis starts at the beginning of the active phase and rapidly reaches an exponential rate. Protein synthesis follows similar kinetics with a lag of about 10 min.

2. Both the relative rates of formation of the three types of RNA (messenger, ribosomal and transfer) and the half life of messenger RNA are the same during germination and during growth. The functional test for messenger RNA reveals its absence in the spore.

3. DNA synthesis, which does not occur until 30 to 40 min. after the onset of germination is then initiated at its maximum rate. Addition of chloramphenicol before the beginning of DNA synthesis inhibits completely this synthesis. If chloramphenicol is added after the beginning of DNA synthesis, a residual synthesis of DNA takes place whose extent depends on the time of addition of chloramphenicol. The kinetics observed suggest that DNA formation requires the prior synthesis of a protein (initiator) and that this protein is absent in the spore.

4. Under normal growth conditions DNA duplication is in correlation with the formation of a division septum. Since during germination the first DNA duplication cycle takes place without any detectable modification in the cytoplasmic membrane, this correlation is not necessary.



Nous remercions M^{me} A. Ryter (Institut Pasteur) pour sa collaboration dans l'étude des aspects cytologiques de la germination et pour la réalisation des photographies au microscope électronique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BALASSA (G.) Dans *Mécanismes de régulation chez les micro-organismes*, 12^e Colloque du C. N. R. S., 1963. Ed. C. N. R. S., 1965, p. 505.
- [2] BALASSA (G.) *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 76, 410.
- [3] BALASSA (G.) *Ann. Inst. Pasteur*, 1966, 110, n° de janvier.
- [4] BRENNER (S.) and HORNY (R. W.) *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, 34, 103.
- [5] BRINKER (E. M.) *Structure and ultrastructure of microorganisms*, 1963. Acad. Press, New York.
- [6] BURTON (K.) *Biochem. J.*, 1956, 315, 62.
- [7] CHAPMAN (G. B.) and TWORRIN (K. H.) *J. Bact.*, 1957, 74, 429.
- [8] DEI (R. H.) and KARASHI (R. T.) *Nature*, 1964, 208, 1092.
- [9] FOLASCHI (A.), SPURCH (J.) and KORNBERG (A.) Dans *Spores '66*, Ed. L. L. Campbell et H. O. Halvorson, Amer. Soc. Microbiol., 1965, p. 88.
- [10] FAN (D. P.), HIGA (A.) and LEVINthal (C.) *J. mol. Biol.*, 1964, 8, 210.
- [11] FITE-JAMES (P. C.) *Can. J. Microbiol.*, 1955, 1, 502.
- [12] FITE-JAMES (P. C.) *Can. J. Microbiol.*, 1955, 1, 525.
- [13] GOLDMAN (M.) and BLUMENFELD (H. J.) *J. Sci.*, 1964, 87, 387.
- [14] HALVORSON (H.) Dans *Control mechanisms in respiration and fermentation*, Ed. B. Wistrom, The Ronald Press, 1963, p. 3.
- [15] HERMIER (J.) *Ann. Inst. Pasteur*, 1962, 102, 520.
- [16] HIGA (A.) Ph. D. Thesis, Massachusetts Institute of Technology, 1964.
- [17] HILLS (G. M.) *J. gen. Microbiol.*, 1950, 4, 38.
- [18] JACOB (F.), BRENNER (S.) and COTRAN (F.) *Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol.*, 1963, 28, 329.
- [19] KAWATA (T.), INOUE (T.) and TAKAGI (A.) *Jap. J. Microbiol.*, 1963, 7, 25.
- [20] KJELLBERG (N. D.) *Dynamics of bacterial growth*, Nyt Nordisk Forlag, Arnold Busck, København, 1963.
- [21] KNAYS (G.) and HUNTER (J.) *J. Bact.*, 1960, 57, 23.
- [22] KORNBERG (A.) *Enzymatic synthesis of DNA*, John Wiley and Sons Inc., New York, 1961, 103 pages.
- [23] KOSAKI (Jap. J. Bact.), 1959, 14, 161.
- [24] LARK (K. G.) and LARK (C.) *J. mol. Biol.*, 1964, 10.
- [25] LEVINSON (H. S.) and HYATT (M. T.) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1963, 102, 773.
- [26] LEVINthal (C.), KENYAN (A.) and HIGA (A.) *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1962, 48, 1913.
- [27] MULLER (O.) and HANAWALT (P. C.) *J. mol. Biol.*, 1961, 3, 121.

- [28] MAYALL (B. H.) and ROBINOW (C. F.). *J. appl. Bact.*, 1957, 20, 333.
- [29] MEJBAUM (W.). *Z. physiol. Chem.*, 1953, 258, 117.
- [30] MURRELL (W. G.). *Symp. Soc. gen. Microbiol.*, 1961, 11, 100.
- [31] NEIDHARDT (F. C.). In *Progress in nucleic acid research*, Ed. J. N. DAVIDSON et W. E. COHN, Academic Press, 1964, 3, 145.
- [32] O' BRIEN (R. T.) and CAMPBELL (L. L.). *J. Bact.*, 1957, 73, 522.
- [33] OISHI (M.), YOSHIKAWA (H.) and SUEOKA (N.). *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1965, 53, 1476.
- [34] PIÉCHAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, 86, 787.
- [35] ROBINOW (C. F.). In *The bacteria*, Ed. I. C. GUNZALLS et R. Y. STANIER, Academic Press, 1960, 1, 207.
- [36] RYTER (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1965, 108, 40.
- [37] RYTER (A.) et JACOB (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1964, 107, 384.
- [38] RYTER (A.) und KELLENBERGER (E.). *Z. Naturforsch.*, 1958, 13 b, 593.
- [39] RYTER (A.) and KELLENBERGER (E.). *J. Ultrastr. Res.*, 1958, 2, 200.
- [40] SCHAEFFER (P.), IONESCO (H.), RYTER (A.) et BALASSA (G.). Dans *Mécanismes de régulation chez les microorganismes*, 124^e Colloque du C. N. R. S., 1963, Ed. C. N. R. S., 1965, p. 553.
- [41] SCHMIDT (G.) and THANNHAUSER (S.). *J. biol. Chem.*, 1945, 161, 83.
- [42] SUEOKA (N.) and YOSHIKAWA (H.). *Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol.*, 1963, 27, 47.
- [43] VINTER (V.). Dans *Spores III*, Ed. L. L. CAMPBELL and H. O. HALVORSON, Amer. Soc. Microbiol., 1965, p. 25.
- [44] WAKE (R. G.). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1963, 13, 67.
- [45] WOESE (C.) and FORRO (J. R.). *J. Bact.*, 1960, 87, 387.

SYNTHÈSES MACROMOLÉCULAIRES AU COURS DE LA GERMINATION DES SPORES DE *B. SUBTILIS*

II. — RÉGULATION

par G. BALASSA et G. CONTESSE

(Service de Physiologie Microbienne,
Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris)

INTRODUCTION

Dans un article précédent (p. 13 et [5]) des événements cytologiques et biochimiques, caractéristiques de la germination des spores en milieu complexe, ont été décrits. Des particularités cinétiques de la synthèse des ARN et des protéines nous ont incités à préciser les mécanismes de régulation de ces synthèses, en étudiant l'effet des acides aminés d'une part, du chloramphénicol d'autre part, sur la synthèse de ces macromolécules.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La souche utilisée est toujours le mutant Ind⁻₁₆₈ de la souche Marburg de *Bacillus subtilis*. La préparation des spores, le milieu complexe et les méthodes utilisées ont été décrits ailleurs [4, 5]. Le milieu minimum de germination est le milieu M 63 (pour 1 litre : KH_2PO_4 , 13,6 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005 g, ajusté à pH 7,2 par KOH), complété par du L-tryptophane (50 $\mu\text{g/ml}$), de L-alanine (50 $\mu\text{g/ml}$), et après stérilisation, par du glucose (à 0,5 p. 100). Dans certaines expériences d'incorporation d'uracile ou de valine radioactifs, ces substances non marquées ont été ajoutées dès le début de la germination (5 $\mu\text{g/ml}$ de chaque) pour éviter de changer la composition du milieu en cours d'expérience. Pour l'incorporation du P^{32} , la concentration en a été ramenée à 10^{-3} M, le milieu étant tamponné par du Tris (10^{-2} M à pH 7,2).

Plusieurs mélanges d'acides aminés ont été employés. L'un, de 18 acides aminés, contenait tous les acides aminés sauf les deux déjà présents ; dans un autre, de 17 acides aminés, la valine était omise, enfin un troisième, de 9 acides aminés, contenait de : arginine, aspartate,

glutamate, histidine, isoleucine, leucine, methionine, phénylalanine et proline. Les deux premiers ont généralement été ajoutés pour 10 $\mu\text{g/ml}$ de chaque acide aminé, le dernier pour 20 $\mu\text{g/ml}$. Les acides aminés (forme L, pour analyse) proviennent de Sigma ou de Nutritional Biochemical Co. Le chloramphénicol (Hoffmann-Laroche) a été utilisé à une concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$.

RÉSULTATS

I. — EFFET DES ACIDES AMINÉS SUR LA GERMINATION.

1° GERMINATION DANS LES MILIEUX SYNTHÉTIQUES. — Dans l'article précédent, la germination a été étudiée en milieu complet, c'est-à-dire dans des conditions optimales qui aboutissent à son évolution à sa vitesse maximum. Cette étude est complétée ici par l'analyse de la germination en différents milieux synthétiques et par la recherche du rôle que peuvent y jouer divers substrats, non indispensables à la croissance.

Nous avons tout d'abord suivi, dans des milieux synthétiques de compositions diverses, les changements de la densité optique d'une suspension de spores au cours de la germination.

Dans le milieu minimum (contenant du glucose, de la L-alanine et du tryptophane) la *phase initiale* de la germination se manifeste normalement par une chute de densité optique et par la perte de la réfringence des spores, mais la *phase active* [5] n'a pas lieu : les bactéries n'émergent pas des tuniques sporales et la densité optique reste constante pendant sept heures (fig. 1). Dans le même milieu, contenant les 18 acides aminés cependant, la phase active se déroule normalement et conduit à la reprise de la croissance. La stimulation de la phase active par les 18 acides aminés est la même, que ceux-ci soient présents, chacun à une concentration de 5 ou de 50 $\mu\text{g/ml}$. Le mélange de 9 acides aminés (voir MÉTHODES) donne une stimulation comparable ou légèrement inférieure (fig. 1 a et b). Par contre l'addition des acides aminés par groupes de 3 ou de 4 ne permet qu'une germination très lente, dont la vitesse dépend des acides aminés choisis (fig. 2). L'arginine, l'acide glutamique et l'acide aspartique font cependant exception : l'addition de l'un d'eux provoque une stimulation notable (fig. 1 b), le mélange aspartate + glutamate a un effet encore plus marqué ; enfin le mélange aspartate + glutamate + arginine + asparagine + glutamine est quelquefois presque aussi efficace que le mélange des 18 acides aminés. Woese [25] a décrit une stimulation importante par l'aspartate et le glutamate ; il a cependant observé (communication personnelle) des réponses variables avec la préparation de spores employée. En conclusion, *aucun acide aminé n'est donc spécifique-*

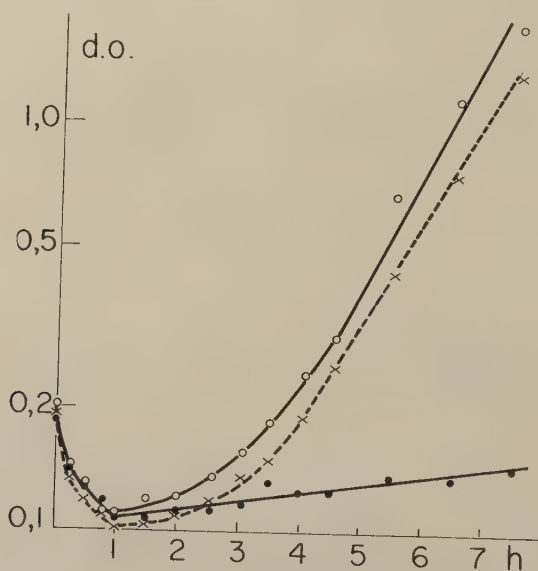


FIG. 1 a.

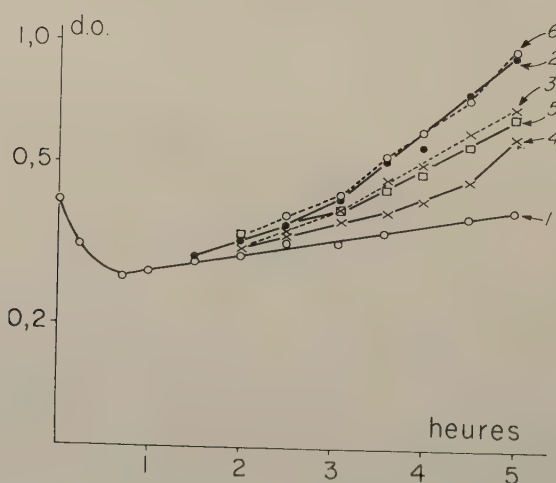


FIG. 1 b.

FIG. 1. — *Effet des acides aminés sur la germination.*

L'évolution de la densité optique des cultures est suivie au cours de la germination des spores en milieu minimum sans addition (a —●—, b 1) ou contenant les acides aminés suivants : 18 acides aminés (a —○—, b 2), 9 acides aminés (voir méthodes; a --- × ---, b 3), glutamate (b 4), glutamate + aspartate (b 5), glutamate, aspartate, arginine, glutamine et asparagine (b 6). Pendant les quatre-vingt-dix premières minutes toutes les courbes se confondent. L'addition d'aspartate ou d'arginine seul donne les mêmes résultat que celle de glutamate.

ment requis pour la germination, mais chacun d'eux possède sa propre capacité de l'accélérer.

D'autres expériences montrent que le glucose est requis pour l'accomplissement de la phase active même en présence de tous les acides aminés. S'il est omis ou remplacé par du citrate, la germination est très ralentie ; si on le remplace par du glycérol, elle se fait avec une demi-heure de retard. Par ailleurs, en présence de glucose et des acides aminés, l'addition des quatre bases principales de l'ARN, de citrate ou d'acétate ne change pas la vitesse de la germination.

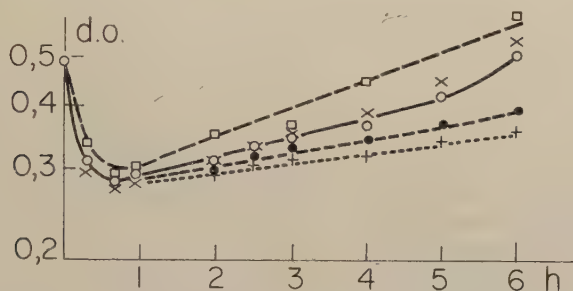


FIG. 2. — Effet de certains acides aminés sur la germination.

Germination en milieu minimum, contenant 20 $\mu\text{g/ml}$ des acides aminés suivants : —○— his, tyr et phe ; —×— thr, pro, met et cys, ---●--- leu, lys et ser, ---+--- val, gly, ser et isoleu. Dans une autre culture (---□---), contenant tous les acides aminés, le glucose a été remplacé par du citrate de sodium.

2° GERMINATION HÉTÉROGÈNE DES SPORES EN ABSENCE DES ACIDES AMINÉS. — Ainsi que nous l'avons vu, après un temps de latence d'au moins quatre à six heures, la densité optique d'une suspension de spores commence à augmenter même en absence des acides aminés (fig. 1a). Pour déterminer s'il s'agit d'une germination lente retardée de toutes les spores, ou bien si une *petite fraction* des spores peut entrer dans la phase active en absence des acides aminés, une suspension de spores chauffées a été étalée sur trois milieux gélosés : le milieu minimum, avec ou sans addition des acides aminés, et le milieu complexe. Le nombre de colonies (tableau I), identique sur milieu complexe et sur milieu minimum contenant les acides aminés est, par contre, dix fois plus faible sur le milieu minimum. Ainsi, bien que l'incapacité à la germination sans acides aminés soit permanente chez la majorité des spores, une certaine fraction (environ 10 p. 100 des spores) peut cependant y échapper.

TABLEAU I. — Germination hétérogène des spores.

Origine des spores :	MILIEU D'ÉTALEMENT		
	Complexe	Minimum + acides aminés	Minimum
	Nombre de colonies		
Milieu complexe.....	6.10 ⁹	5,5.10 ⁹	7,6.10 ⁸
Milieu synthétique :			
carence de carbone.....	1,3.10 ¹⁰	1,9.10 ¹⁰	1,9.10 ⁹
carence d'azote	1,3.10 ¹⁰	1,3.10 ¹⁰	8,1.10 ⁸

3° SYNTHÈSE D'ADN, D'ARN ET DE PROTÉINES AU COURS DE LA GERMINATION EN MILIEU SYNTHÉTIQUE. — Avant de rechercher quel est le mécanisme biochimique de l'effet des acides aminés sur la germination, la synthèse de ces macromolécules a été suivie en milieu synthétique, avec ou sans addition des 18 acides aminés, et comparée à celle observée en milieu complet [5]. *En présence des acides aminés* (fig. 3 a et b), les cinétiques observées rappellent celles décrites en milieu complexe ; la synthèse des ARN débute immédiatement après la phase initiale et précède ici encore celle des protéines d'environ dix à vingt minutes. Celle de l'ADN (non représentée) commence vers cent minutes, et la croissance ne devient exponentielle que vers la cent vingtième minute. Comme en milieu complexe (voir l'article précédent), nous avons mesuré les taux d'incorporation de l'uracile et de la valine radio-actifs, ajoutés à différents temps de la germination. Le rapport du taux de synthèse des ARN au taux de synthèse des protéines diminue au début de la germination, puis passe par un minimum avant de se stabiliser ; ce qui confirme le décalage entre les deux synthèses.

Si la germination se fait *en absence des acides aminés*, les vitesses d'incorporation de l'uracile et de la valine sont d'abord, pendant vingt à quarante minutes, les mêmes qu'en présence des acides aminés, le retard initial de l'incorporation de la valine s'observe encore ici. Ensuite, ces incorporations, plus faibles qu'en présence des acides aminés, restent linéaires pendant plus de trois heures (fig. 3 b), tandis que le rapport des taux d'incorporation de l'uracile et de la valine oscille autour des valeurs minimum, mesurées en milieu contenant les acides aminés.

En conclusion, indépendamment de la présence des acides aminés, la synthèse des ARN commence, à un taux très faible, avant celle des protéines, et les deux synthèses s'accroissent pendant environ

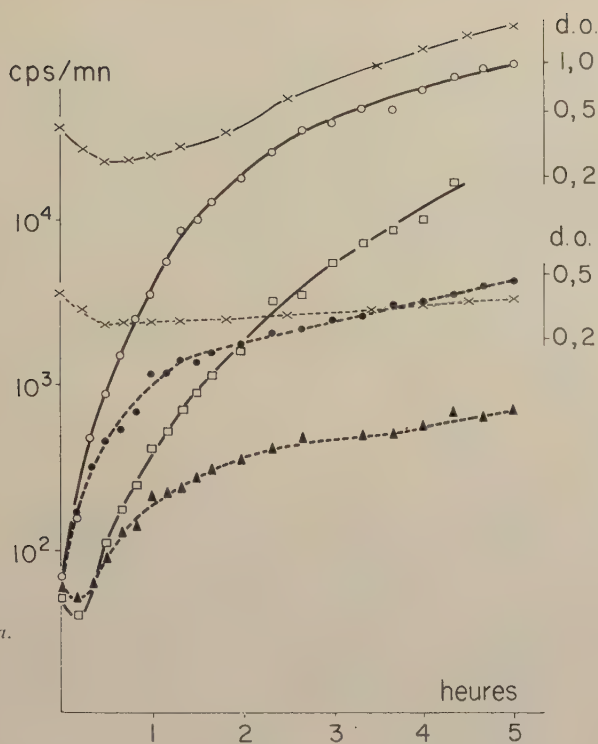


FIG. 3 a.

FIG. 3 b.
↓

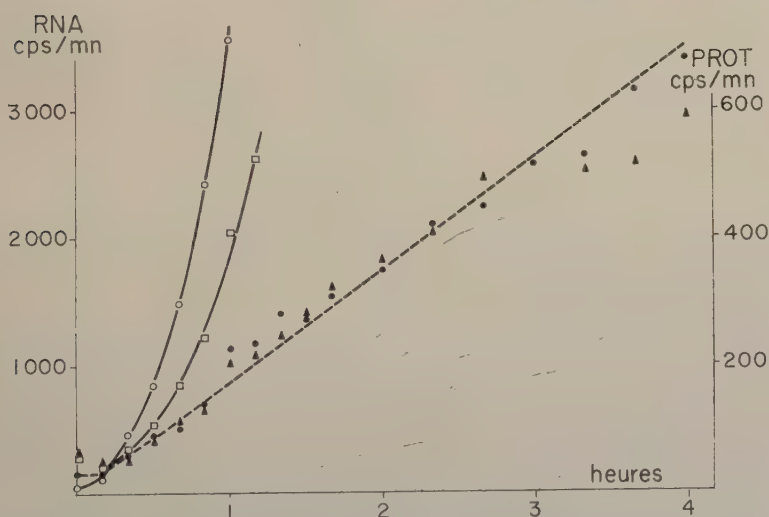


FIG. 3. — Synthèse des ARN et des protéines.

a) L'incorporation de l'uracile- ^{14}C ($\circ$, $\bullet$) et de la valine- ^{14}C ($\blacktriangle$, $\square$) est mesurée au cours de la germination en milieu minimum, avec (—) ou sans (---) les 18 acides aminés. $\times$ = densité optique. b) Les mêmes résultats sont représentés en coordonnées linéaires.

trente minutes. Elles ne se font ensuite, en absence des acides aminés, qu'à une vitesse constante toujours faible, sans augmentation de densité optique ni émergence des bactéries.

4° SYNTHÈSE DES ARN APRÈS TRANSFERT EN MILIEU PAUVRE (« *shift-down* »). — Le contrôle exercé par des acides aminés sur la synthèse des ARN a été mis en évidence, chez des bactéries en croissance, dans trois situations fort étudiées ; soit au cours d'une carence d'un mutant auxotrophe en son acide aminé exigé, soit après transfert des bactéries d'un milieu riche en acides aminés

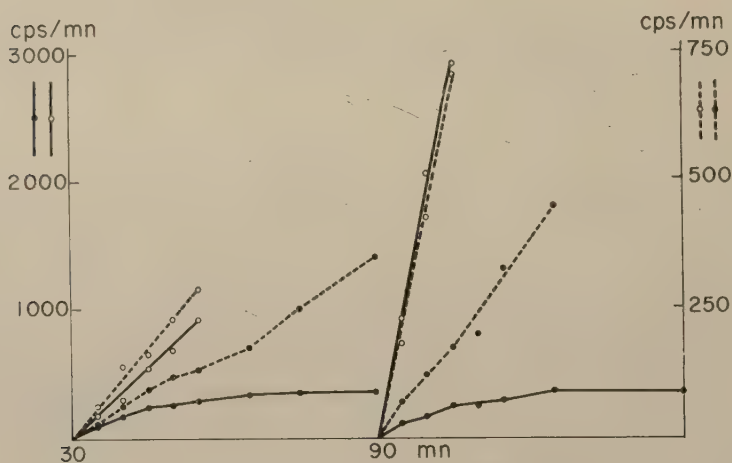


FIG. 4. — Synthèse des ARN et des protéines après transfert en milieu pauvre (*shift-down*).

Des spores en germination depuis trente ou quatre-vingt-dix minutes en milieu minimum contenant les 17 acides aminés sont filtrés et resuspendues dans le même milieu avec (○) ou sans (●) les acides aminés. L'incorporation de l'uracile- ^{14}C (---) et de valine- ^{14}C (—) est mesurée.

dans un milieu minimum ou vice-versa (revues dans [10, 18]). De tels transferts, auxquels nous conserverons leur désignation anglaise de *shift-down* et *shift-up*, respectivement, ont été effectués au cours de la germination. Si on transfère des bactéries, à 30 ou à 90 min. de germination, d'un milieu contenant tous les acides aminés, à un milieu qui en était dépourvu (*shift-down*), on constate, comme avec des bactéries en croissance, que la *synthèse des ARN*, immédiatement ralentie, *s'arrête rapidement*, tandis que celle des protéines ne diminue que graduellement (fig. 4). L'inhibition de la synthèse des ARN est moins marquée à 30 min. qu'à 90 min.

5° EFFET DE L'ADDITION DES ACIDES AMINÉS (« *shift-up* »). — Nous avons vu qu'en absence des acides aminés les spores germées incorporaient de l'uracile à un taux faible, constant pendant des heures. L'addition des acides aminés double immédiatement le taux de synthèse des ARN (fig. 5). Cette stimulation initiale s'effectue en moins d'une minute, elle a lieu également en présence de chloram-

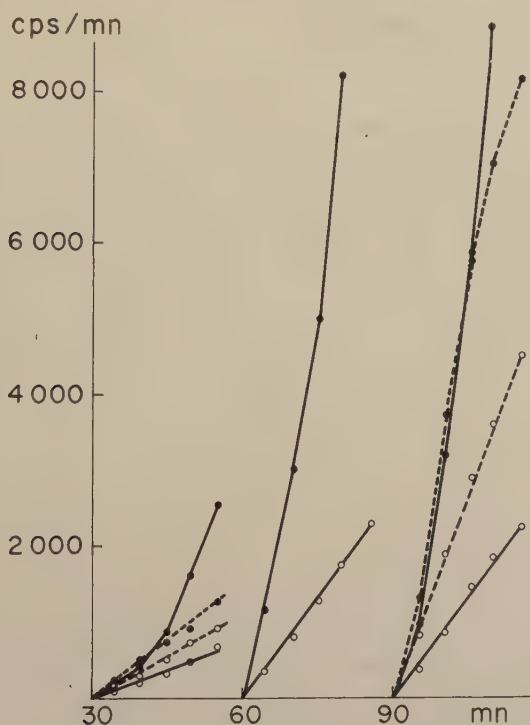


FIG. 5. — Synthèse des ARN après transfert en milieu riche (*shift-up*).

Des spores en germination en milieu minimum reçoivent, aux temps indiqués, de l'uracile- ^{14}C seul (O), avec un mélange de 17 acides aminés (●), avec (---) ou sans (—) chloramphénicol.

phénicol. Ensuite, la synthèse des ARN s'accélère rapidement tout comme dans les expériences où la germination se déroulait entièrement en présence des acides aminés. Cependant, cette dernière accélération n'est pas observée en présence de chloramphénicol. Ces expériences indiquent que : 1° la synthèse des ARN est immédiatement stimulée par les acides aminés, même en absence des synthèses protéiques ; 2° la stimulation initiale, bien que relativement

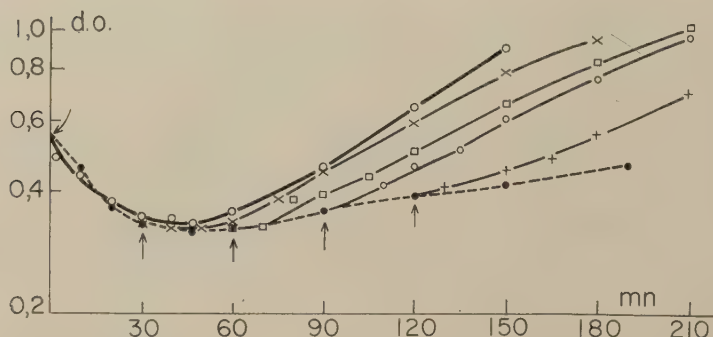


FIG. 6. — Effet d'une addition retardée d'acides aminés sur la germination.

A des spores en germination en milieu minimum on ajoute un mélange de 17 acides aminés (---●--- témoin). Addition après zéro (○), trente (x), soixante (□), quatre-vingt-dix (○) et cent vingt minutes (+) d'incubation.

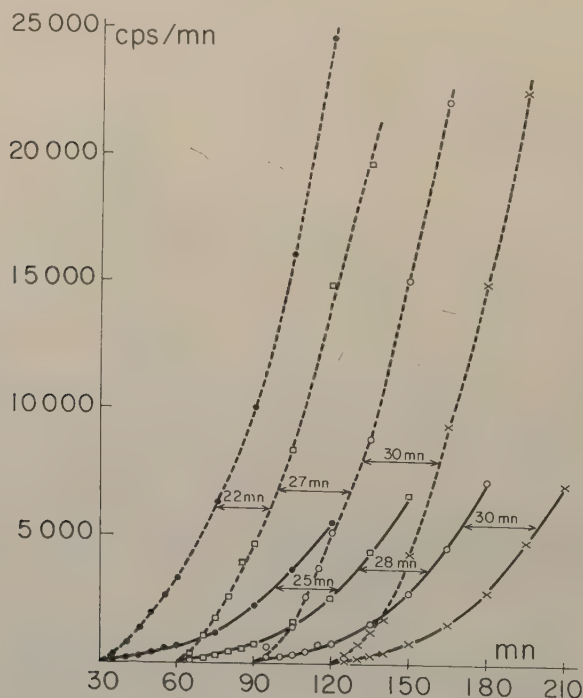


FIG. 7. — Effet d'une addition retardée d'acides aminés sur la synthèse d'ARN.

Germination comme dans l'expérience de la figure 6. L'uracile- ^{14}C (---) ou la valine- ^{14}C (—) sont ajoutés, en même temps que les acides aminés, après trente (●), soixante (□), quatre-vingt-dix (○) et cent vingt minutes (x) d'incubation. Les chiffres indiquent le décalage des courbes, en minutes.

faible (deux fois plus), permet cependant, après formation de nouvelles protéines, l'accélération de toutes les synthèses et la germination normale des bactéries. Le contrôle bien connu de la synthèse des ARN par les acides aminés est ainsi mis en évidence également au cours de la germination.

6° GERMINATION DES SPORES OBTENUES EN MILIEU SYNTHÉTIQUE. —

Dans les expériences précédentes, les spores utilisées étaient obtenues en milieu complexe, riche en acides aminés. Or, il est connu que la composition des bactéries (en particulier leur teneur en enzymes de biosynthèse des acides aminés) et par conséquent leur réaction au transfert dans un milieu pauvre, dépendent de leur origine ; on devait donc se demander si l'effet observé des acides aminés sur la germination était indépendant du milieu de sporulation. Les expériences ont été répétées avec des spores formées en milieu minimum épuisé soit en glucose, soit en azote. Elles ont montré que l'effet des acides aminés sur l'évolution de la densité optique et la synthèse des ARN ne dépend pas des conditions dans lesquelles les spores se sont formées. La fraction de spores, capables de former des colonies sur milieu minimum (tableau I), est également la même dans les trois lots de spores.

7° ABSENCE DE DÉVELOPPEMENT EN MILIEU MINIMUM. —

Nous venons de voir qu'en milieu minimum la phase active de la germination n'a pas lieu, malgré une faible synthèse d'ARN et de protéines. Bien qu'incapables d'assurer la germination, ces synthèses pourraient néanmoins permettre, après addition des acides aminés, une germination ultérieure accélérée. Il n'en est rien cependant : que l'on suive l'évolution de la densité optique (fig. 6), ou celle des synthèses des ARN et des protéines (fig. 7), on constate qu'une préincubation même prolongée (cent vingt minutes) en absence d'acides aminés n'accélère pas la germination ultérieure. (Une accélération faible après une incubation de trente minutes s'explique par le fait que la phase initiale n'est accomplie, chez un certain nombre de spores, que pendant cette incubation). Woese [25] avait abouti à des conclusions semblables.

II. — EFFET DU CHLORAMPHÉNICOL SUR LA SYNTHÈSE DES ARN.

1° ETUDES EN MILIEU COMPLEXE. —

Inhibiteur spécifique de la synthèse des protéines, le chloramphénicol permet d'étudier les relations entre la synthèse des ARN et celle des protéines. Nous l'avons, dans ce but, utilisé au cours de la germination.

La synthèse des protéines (mesurée par l'incorporation de la valine-¹⁴C dans la fraction, insoluble dans le TCA à 5 p. 100) est inhibée au moins à 95 p. 100 par le chloramphénicol, ajouté au

cours de la germination. Quant aux ARN, *ajouté au temps zéro*, le chloramphénicol laisse subsister une synthèse d'ARN faible et linéaire (fig. 8). Lorsqu'il est *ajouté plus tard*, mais encore préco-
 ment, une faible quantité d'ARN se forme au même taux qu'en
 absence d'antibiotique, puis la synthèse se ralentit brusquement,
 et continue à un taux réduit. Trois paramètres de la synthèse
 des ARN peuvent donc être déterminés pour chaque temps d'addi-
 tion de chloramphénicol : 1° le taux initial linéaire ; 2° la quantité

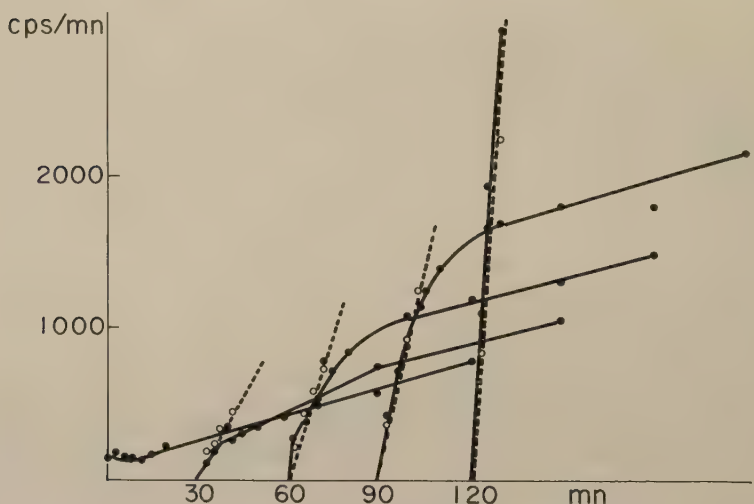


FIG. 8. — Synthèse des ARN en présence de chloramphénicol.

Germination en milieu complexe. Aux temps indiqués, l'uracile- ^{14}C est ajouté
 seul (---○---) ou avec du chloramphénicol (—●—).

d'ARN synthétisée à ce taux (mesurée par le « niveau de cassure »
 des courbes) ; et enfin 3° le taux de synthèse résiduel, constant
 pendant plusieurs heures. On voit (fig. 8) que le « niveau de cassure »
 augmente rapidement au cours de la germination, par contre le
 taux résiduel, établi en présence de chloramphénicol, est le même
 que l'antibiotique soit ajouté au temps zéro ou à des temps ultérieurs,
 et n'augmente que si l'addition du chloramphénicol est très tardive.

Il est probable que le « niveau de cassure » reflète la quantité
 d'une protéine supposée *ribosomale*, présente au moment de l'addi-
 tion de l'antibiotique et utilisée au cours de la synthèse des ARN
 (voir Discussion). L'expérience suivante est destinée à démontrer
 l'épuisement de cette protéine en présence de chloramphénicol.
 Une culture est exposée à l'antibiotique entre 60 et 90 min. de

germination, cette durée étant suffisante pour que la synthèse des ARN atteigne son « niveau de cassure » (voir fig. 8). Elle est alors filtrée, lavée, resuspendue et divisée en plusieurs portions. L'une sert à observer la reprise de la synthèse des ARN, aux autres du chloramphénicol est réajouté après des temps variés d'incubation (fig. 9). Les courbes ainsi obtenues rappellent celles de la figure 8 ; elles montrent que la capacité des bactéries d'accumuler des ARN en présence de chloramphénicol, réduite au cours de l'incubation de trente minutes avec l'antibiotique, réapparaît

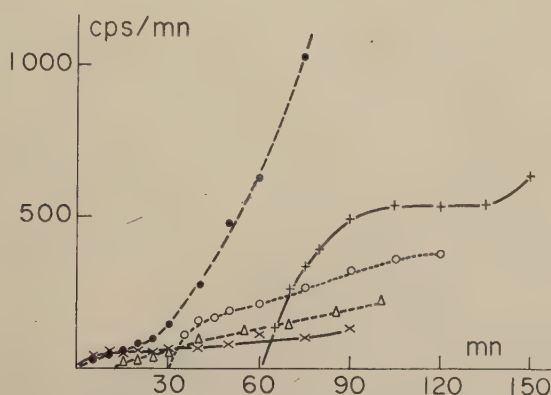


FIG. 9. — *Traitement répété au chloramphénicol.*

Germination en milieu complexe. A soixante minutes du chloramphénicol est ajouté à la culture, qui est ensuite filtrée à quatre-vingt-dix minutes, lavée et resuspendue dans le même volume de milieu neuf. De l'uracile- ^{14}C est ajouté soit seul, immédiatement après la filtration (---●---), soit avec du chloramphénicol, zéro (x), quinze (Δ), trente (○) et soixante (+) minutes après la filtration (l'échelle des temps commence après la filtration).

lorsque les bactéries sont resuspendues dans le milieu neuf, et augmente comme dans des spores au début de leur germination.

Il est connu que les ARN, accumulés par des bactéries en présence de chloramphénicol, sont métaboliquement instables et se dégradent, dans certaines conditions du moins, quand on enlève l'antibiotique [21]. Cela est également vrai pendant la germination ; cependant, les cinétiques de dégradation sont extrêmement variables suivant le milieu de germination, le moment de l'addition du chloramphénicol, le temps d'incubation et le milieu utilisé après le traitement. Un exemple est donné figure 10 : des spores, ayant germé pendant quatre-vingt-dix minutes en milieu complexe sont exposées pendant trente minutes supplémentaires au chloramphénicol en présence d'uracile- ^{14}C ; elles sont alors filtrées, lavées et

resuspendues dans trois milieux différents : milieu synthétique contenant des acides aminés, milieu complexe, et enfin milieu complexe contenant de l'actinomycine. Dans les trois suspensions une grande partie des ARN radioactifs initialement présents est dégradée (notons cependant que cette dégradation est toujours plus lente que celle des ARN messagers [5]).

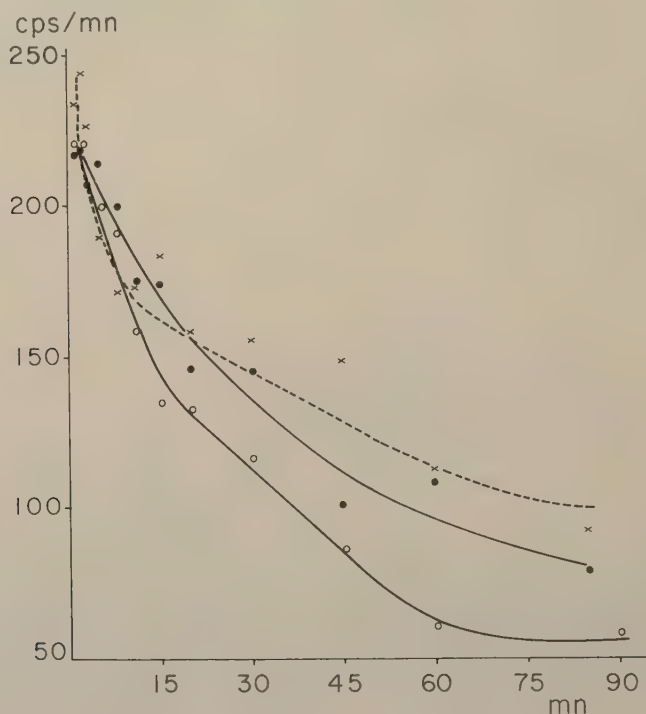


FIG. 10. — Dégradation des ARN formés en présence de chloramphénicol.

Germination en milieu complexe. A quatre-vingt-dix minutes, l'uracile- ^{14}C et le chloramphénicol sont ajoutés ensemble à la culture, qui est ensuite filtrée à cent vingt minutes, lavée et resuspendue soit dans le milieu synthétique contenant tous les acides aminés (x), soit dans le milieu complexe, avec (O) ou sans (●) actinomycine (l'échelle des temps commence après filtration).

2° ETUDES EN MILIEU SYNTHÉTIQUE. — L'effet du chloramphénicol sur les trois paramètres de la synthèse des ARN a été également étudié en milieux synthétiques. En présence des acides aminés, les courbes (fig. 11) sont qualitativement identiques à celles obtenues en milieu complexe (fig. 8). Par contre, si les acides aminés sont omis, on observe une stimulation marquée de la synthèse initiale

par le chloramphénicol (fig. 5). Une telle situation, déjà notée chez des bactéries en croissance [20] est généralement attribuée à l'effet des acides aminés qui s'accumulent en absence de synthèse protéique. La stimulation par le chloramphénicol est d'ailleurs plus faible que celle provoquée par l'addition des acides aminés ; elle est d'autant plus forte que l'addition de l'antibiotique est plus tardive, ce qui suggère que la capacité de synthétiser des acides aminés, faible au départ, augmente pendant la germination.

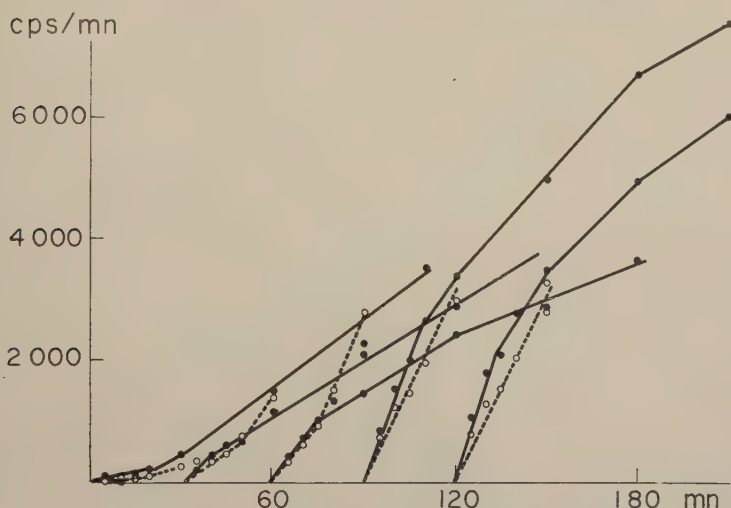


FIG. 11. — Synthèse des ARN en milieu minimum en présence de chloramphénicol.

Germination en milieu contenant tous les acides aminés. Aux temps indiqués, l'uracile- ^{14}C est ajouté seul (---○---) ou avec du chloramphénicol (—●—).

Nous nous sommes enfin demandé comment les acides aminés, ajoutés au milieu minimum en même temps que le chloramphénicol, affecteraient les valeurs des trois paramètres en question. L'expérience montre (fig. 12) qu'ils les augmentent toutes les trois.

3° REVERSION DE L'EFFET DU CHLORAMPHÉNICOL. — Lorsque le chloramphénicol est ajouté au début de la germination, il empêche toutes les manifestations visibles de la phase active, bien qu'une synthèse d'ARN, lente mais significative, subsiste. La situation rappelle celle de la germination en absence d'acides aminés. Cette fois encore on peut se demander si cette synthèse (ou d'autres réactions s'effectuant en même temps qu'elle) permet d'accélérer, une fois l'antibiotique enlevé, la germination ultérieure de la spore.

L'expérience (fig. 13) montre qu'il n'en est rien : les courbes d'incorporation de l'uracile et de la valine sont les mêmes que la culture ait été ou non préalablement traitée au chloramphénicol. Cela nous montre de plus, qu'ajouté au début de la germination, le chloramphénicol n'a pas d'effet toxique persistant sur les capacités biosynthétiques ultérieures des bactéries traitées.

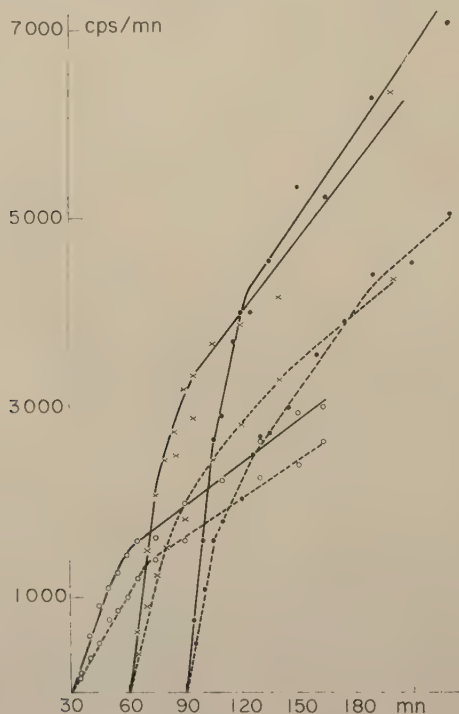


FIG. 12. — Effet des acides aminés sur la synthèse des ARN en présence de chloramphénicol.

L'uracile- ^{14}C et le chloramphénicol sont ajoutés soit seuls (---), soit avec le mélange des 17 acides aminés (—), à trente (O), soixante (X) et quatre-vingt dix (●) minutes de germination en milieu minimum.

Par contre, si l'antibiotique est ajouté plus tard, un effet toxique apparaît ; après resuspension en milieu frais, la synthèse des ARN et des protéines ne reprend que lentement (fig. 14). Cet effet s'accroît avec le temps ; on sait d'ailleurs que les bactéries en phase végétative, traitées au chloramphénicol, passent par une longue latence avant de reprendre leur croissance. Remarquons enfin que cet effet toxique affecte à peu près dans les mêmes proportions la synthèse des ARN et celle des protéines.

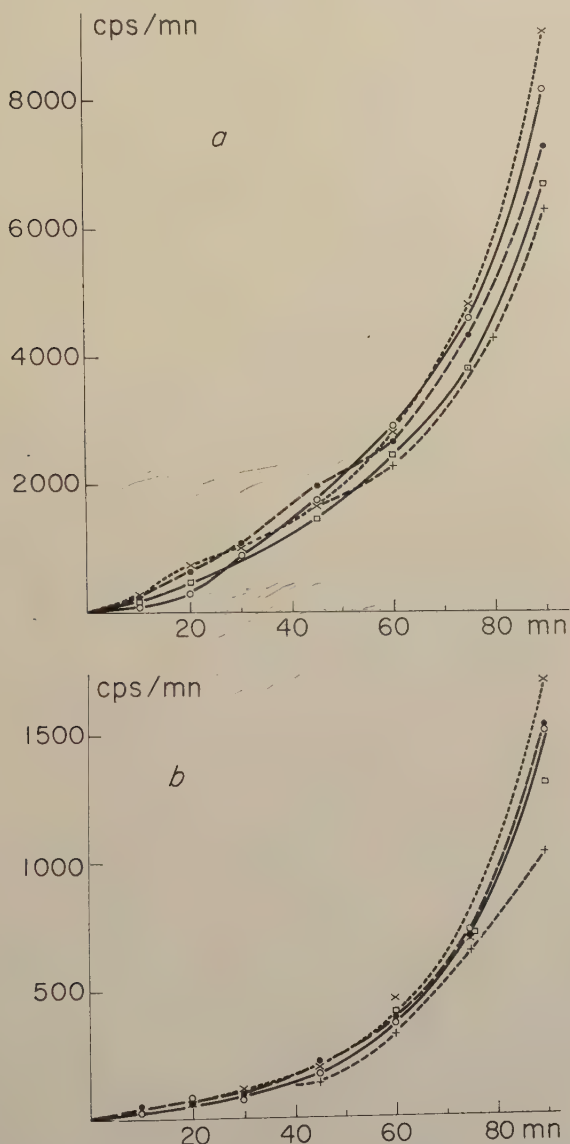


FIG. 13. — Réversion de l'effet du chloramphénicol : traitement précoce.

Des spores sont incubées en milieu complexe, en présence de chloramphénicol, pendant quinze (●), trente (×), soixante (□) ou quatre-vingt-dix (+) minutes, elles sont ensuite filtrées, lavées et resuspendues dans du milieu complexe neuf. (Témoin sans chloramphénicol : ○.) Après la filtration, l'incorporation de l'uracile- ^{14}C (a) et de la valine- ^{14}C (b) est mesurée.

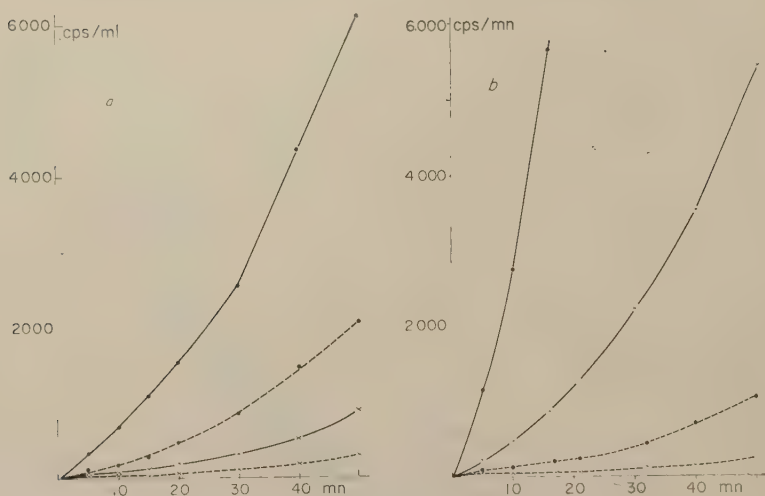


FIG. 14. — Réversion de l'effet du chloramphénicol : traitement tardif.

Des spores, germées en milieu complexe pendant soit trente minutes (a), soit soixante-quinze minutes (b), sont ensuite traitées au chloramphénicol pendant trente minutes supplémentaires, filtrées, lavées et resuspendues dans du milieu complexe neuf. L'incorporation de l'uracile- ^{14}C (●) et de la valine- ^{14}C (×), ajoutés après filtration, est mesurée dans les cultures témoins (—) et les cultures traitées (- - -).

DISCUSSION

Le taux de synthèse des ARN et des protéines varie au cours de la germination avec le temps et avec la composition du milieu. La question se pose donc de savoir quels peuvent être les mécanismes, susceptibles de contrôler la vitesse de synthèse de ces macromolécules. Nous envisagerons d'abord le rôle joué par les acides aminés dans la synthèse des ARN, ensuite l'effet de l'inhibition des synthèses protéiques sur la formation des ARN. Nous essaierons enfin d'analyser les relations entre les synthèses d'ARN et de protéines au cours de la germination.

1° EFFET DES ACIDES AMINÉS. — Des observations de nombreux auteurs ont montré que les bactéries possèdent, pendant la phase active de la germination, des besoins nutritifs particuliers, différents aussi bien de ceux de la phase initiale que des besoins pendant la croissance exponentielle, et variables selon l'espèce. Ces besoins sont le plus souvent satisfaits par des acides aminés (voir p. ex. [23, 9, 25] et revues dans [17, 14]). Nous avons illustré ce besoin

en acides aminés pendant la phase active de la germination de *B. subtilis*. L'effet observé ne relève pas d'un besoin d'un quelconque acide aminé particulier, bien que chaque acide aminé possède une certaine capacité d'y contribuer, probablement selon la facilité avec laquelle il est converti en d'autres acides aminés. Cela implique que les spores sont démunies ou pauvres en certains enzymes de biosynthèse des acides aminés. Les différences concernant la stimulation par certains acides aminés, selon les espèces ou les préparations de spores, pourraient refléter des variations dans la teneur en ces enzymes. L'existence de 10 p. 100 de spores capables de germer en absence des acides aminés est due vraisemblablement à la présence de spores ayant conservé une plus grande quantité de ces enzymes.

L'effet des acides aminés, nous l'avons vu, *porte directement sur la synthèse des ARN*, sans intermédiaire de nouvelle synthèse protéique. Il apparaît donc que les besoins nutritifs particuliers de la phase active de la germination peuvent être attribués, du moins en partie, au contrôle exercé par les acides aminés sur la synthèse des ARN. L'hypothèse généralement avancée pour rendre compte du rôle catalytique des acides aminés dans la synthèse des ARN est que les ARN solubles non chargés inhiberaient la synthèse des ARN (voir revues dans [10, 18]). Cette régulation par les acides aminés existe bien chez *B. subtilis*, puisque la synthèse des ARN cesse brusquement après transfert des bactéries végétatives dans un milieu pauvre (expériences inédites); il a été également observé pendant la sporulation [3]. En ce qui concerne la germination, puisque les spores contiennent des ARN solubles biologiquement actifs [4], on peut s'attendre à y retrouver encore le même contrôle. Les expériences décrites dans le présent travail confirment pleinement cette hypothèse, expliquant ainsi les besoins particuliers de la phase active de la germination en acides aminés.

Il est surprenant de constater que le milieu dans lequel les spores ont été formées n'a apparemment aucun effet sur leur besoin en acides aminés pendant la germination. Il semble donc que les spores n'aient pas la « mémoire » du milieu de sporulation et que leur composition en soit relativement indépendante. Il est cependant nécessaire de remarquer que la sporulation ne commence qu'après l'épuisement du milieu; la possibilité demeure donc que le métabolisme des bactéries pendant la sporulation soit sensiblement identique dans les trois milieux.

2° EFFET DU CHLORAMPHÉNICOL. — L'inhibition des synthèses protéiques par le chloramphénicol a deux effets sur la synthèse des ARN. Le premier, immédiat, ne se manifeste qu'en milieu dépourvu d'acides aminés: il s'agit d'une *stimulation* attribuée à l'accumulation d'acides aminés libres [20]. Le second effet, par contre, est *l'inhibition graduelle* et incomplète de la synthèse d'ARN. Les

deux effets se retrouvent au cours de la germination : en effet, nous avons observé en milieu minimum une stimulation de la synthèse initiale ; d'autre part, en présence de chloramphénicol la cinétique de synthèse des ARN au cours de la germination ressemble, dans tous les milieux étudiés, à celle que Kurland et Maaløe [13] ont décrite chez des bactéries en croissance, soumises à de fortes concentrations de chloramphénicol. D'après ces auteurs, le chloramphénicol inhibe la synthèse de protéine (s) nécessaire (s) à la formation des ribosomes. Quand cette protéine, probablement une protéine ribosomale, est épuisée, la synthèse d'ARN ribosomaux s'arrête, tandis que la synthèse d'ARN solubles continue à son taux normal, ce qui explique l'existence d'une synthèse résiduelle.

Une présomption supplémentaire en faveur de cette interprétation a été apportée dans une publication précédente [2], par l'examen des ARN synthétisés au cours de la germination en présence de chloramphénicol. Si celui-ci est ajouté à temps zéro, la majorité de la radio activité incorporée se trouve dans le pic 4 S ; s'il est ajouté plus tard, on observe encore une proportion élevée de radioactivité dans ce pic, bien qu'on en trouve également dans les fractions ribosomales. Il faut cependant rappeler que ces expériences sont soumises aux critiques formulées précédemment (p. 5 et [4]), concernant l'extraction et la caractérisation des ARN.

Le *taux de synthèse résiduel* reste constant dans un milieu donné, quel que soit le temps de l'addition du chloramphénicol, et n'augmente que lorsque la division cellulaire a commencé. S'il est donc vrai que la synthèse résiduelle est principalement celle d'ARN solubles, son taux constant indiquerait que la vitesse de synthèse des ARN solubles ne dépend que de la quantité d'ADN (ou le nombre de sites de formation de ces ARN) présente dans les cellules [12].

Si l'on accepte l'interprétation de Kurland et Maaløe [13] ; le « *niveau de cassure* » observé serait une mesure indirecte de la quantité de protéines « ribosomales » libres, présentes dans la cellule au moment de l'addition de l'antibiotique. Cette hypothèse nous amène donc à admettre que l'augmentation rapide du « *niveau de cassure* » indique l'accumulation d'une protéine, supposée ribosomale. La spore serait ainsi dépourvue de cette protéine, dont la formation préférentielle et l'accumulation au cours de la germination serait une condition préalable à la synthèse de ribosomes.

L'addition des acides aminés au milieu minimum, contenant du chloramphénicol, augmente à la fois la vitesse initiale de la synthèse des ARN, le « *niveau de cassure* » et le *taux résiduel*. La stimulation des synthèses initiales et résiduelles est en accord avec les observations [8, 19, 15] qui indiquent que le contrôle par les acides aminés agit aussi bien sur l'ARN ribosomal que soluble. L'augmentation du « *niveau de cassure* » reste cependant inexpiquée.

Enfin, nous avons vu que l'*effet toxique* du chloramphénicol, nul au début de la germination, apparaissait progressivement, la toxicité étant d'autant plus prononcée que l'antibiotique est ajouté plus tard. Comme la quantité d'ARN, synthétisé en présence de chloramphénicol, augmente également lorsque la germination progresse, il est possible, comme cela a été observé chez le mutant RC_{rrl} de *E. coli* (1), que cet ARN soit lui-même responsable de l'effet toxique observé.

3° LE RÔLE DES RIBOSOMES ET DES PROTÉINES RIBOSOMALES. — La synthèse des ARN commence, nous l'avons vu, dès le début de la germination et devient très vite exponentielle. Environ 80 p. 100 des ARN stables, synthétisés pendant cette période, sont constitués d'ARN ribosomiaux, bientôt incorporés dans des ribosomes [2]. Ces derniers, presque entièrement absents des spores, sont d'ailleurs rapidement synthétisés pendant la germination [27]. La synthèse des protéines pendant cette période est retardée d'environ dix minutes par rapport à celle des ARN. Ces données suggèrent une *augmentation exponentielle* du nombre des ribosomes, dont la synthèse serait donc *autocatalytique* : les ribosomes préexistants interviendraient dans la synthèse de nouveaux ribosomes, nécessaires à la formation de protéines. La situation décrite ici présente une certaine analogie avec celle qu'on observe chez des bactéries carencées en magnésium : dans ce dernier cas, il a été montré que la synthèse des ribosomes est autocatalytique [16].

Nous avons vu ailleurs [5] que les taux de synthèse des trois types d'ARN restent pendant la germination en rapport constant entre eux, ce rapport étant le même que pendant la croissance. D'autre part, la synthèse des ARN, exponentielle dès le début, commence à un taux extrêmement faible, même en milieu complexe. On peut donc se demander quel est le facteur qui limite la synthèse des trois ARN au début de la germination. Tous les systèmes, invoqués pour la régulation de la synthèse des ARN chez des bactéries en croissance, s'observent également au cours de la germination : nous avons discuté le contrôle par les acides aminés, le rôle d'une protéine « ribosomale » et la synthèse autocatalytique des ribosomes. En ce qui concerne les *acides aminés*, bien que limitants en milieu minimum, ils ne peuvent pas être invoqués pour expliquer l'évolution de la synthèse des ARN dans des milieux riches. L'absence présumée de *protéines « ribosomales »* rend assez bien compte des effets exercés par le chloramphénicol ; par contre, elle ne saurait expliquer la limitation de la synthèse des ARN au

(1) Nous n'avons pas pu tenir compte ici des articles parus à ce sujet dans *Spores III*, Campbell (L. L.) and Halvorson (H. O.) eds. 1965. Amer. Soc. Microbiol.

cours de la germination normale. En effet, la limitation due à la carence en ces protéines ne peut pas être de longue durée puisque : 1° les synthèses d'ARN ribosomaux et solubles sont entre elles dans des proportions normales dès le début de la germination, 2° ces protéines s'accumulent rapidement. D'autre part, le principal facteur limitant pourrait concerner les *capacités* des bactéries à synthétiser des ARN en général, par exemple la formation de l'énergie, des précurseurs, ou l'activité de l'ARN-polymérase, etc. Dans ce cas, on s'attendrait à ce que l'inhibition spécifique de la synthèse d'ARN ribosomaux par le chloramphénicol, au début de la germination, permette, par compensation, une synthèse plus rapide d'autres ARN et que, par conséquent, le chloramphénicol ne puisse diminuer, pendant cette période, la synthèse totale des ARN. Cependant une telle compensation n'a été observée à aucun moment ; par ailleurs, nous avons déjà remarqué que ni l'apport de l'énergie dû à l'arrêt de la synthèse protéique, ni l'addition des 4 bases ne stimulent la synthèse des ARN. Aucun des systèmes de régulation précédents ne semble donc pouvoir expliquer, à lui seul, l'ensemble des faits observés.

Rappelons maintenant que les deux propriétés qui caractérisent particulièrement la spore sont : l'insuffisance des ribosomes et l'absence d'une protéine « ribosomale ». Les ribosomes présents semblent déterminer la vitesse de synthèse d'ARN ribosomaux ; il a été suggéré dans d'autres cas [6, 7, 24], qu'ils interviennent également dans la synthèse (ou détachement) des ARN messagers. Rien ne s'oppose à ce qu'un tel mécanisme joue dans la formation de tous les ARN : ribosomaux, messagers et solubles. Pour expliquer la synthèse exponentielle des trois types d'ARN, dans des proportions constantes au cours de la germination, nous proposons donc le modèle suivant : 1° *le nombre limité des ribosomes détermine à chaque moment la vitesse de synthèse des trois types d'ARN*, 2° *la formation de nouveaux ribosomes dépend des ribosomes préexistants d'une part, d'une protéine « ribosomale », synthétisée préférentiellement au cours de la germination, d'autre part*. Ce modèle permet également de rendre compte de plusieurs observations :

a) Le décalage de dix minutes observé entre les cinétiques de synthèse d'ARN et de protéines s'expliquerait par le temps, nécessaire à la formation de ribosomes complets et fonctionnels à partir d'ARN ribosomal (ou son précurseur), à l'attachement de l'ARN messager et à la synthèse de la chaîne polypeptidique elle-même. Il est d'ailleurs possible que la formation de ribosomes complets soit plus lente dans les spores germées que dans les bactéries végétatives, à cause de l'insuffisance de protéines « ribosomales ».

b) La faible teneur en protéines « ribosomales » explique aussi les observations de Woese [26] concernant la présence de ribosomes

d'un type nouveau au cours de la germination. Ces particules ressemblent d'ailleurs aux particules incomplètes formées en présence de chloramphénicol [22].

c) Enfin, si les synthèses pendant la germination dépendent en premier lieu de la formation des ribosomes, elle-même nécessitant la synthèse de protéines ribosomales, il est facile de comprendre que la synthèse d'ARN en présence de chloramphénicol ne contribue en rien à la germination. Il est également possible que l'absence de germination dans un milieu dépourvu d'acides aminés soit due à ce que des ribosomes ne se forment pas dans ces conditions, faute de protéine « ribosomale ».

Remarquons finalement, que l'étude de la germination permet de déterminer, indirectement il est vrai, la présence ou l'absence dans la spore de certains constituants, intervenant dans les synthèses macromoléculaires. Les données recueillies au cours de ce travail permettent de dresser le bilan suivant : présence probable de l'ADN-polymérase et des enzymes qui forment les précurseurs d'ADN, mais absence de la protéine initiatrice de la synthèse d'ADN ; présence de l'ARN-polymérase, des enzymes de dégradation des ARN, des ARN solubles et des enzymes d'activation, absence de la protéine « ribosomale » libre, et enfin, absence d'au moins certains enzymes de synthèse des acides aminés.

RÉSUMÉ

L'étude de la *régulation* des synthèses d'ARN et de protéines au cours de la germination conduit aux constatations suivantes :

1° Même chez une souche prototrophe, des acides aminés sont requis pour que s'effectue normalement la phase active de la germination. Lorsque ces acides aminés sont omis, un renouvellement continu mais lent des ARN et des protéines a lieu qui ne permet cependant pas le développement de la spore au-delà de la phase initiale.

2° Cette nécessité des acides aminés pour la germination s'explique par leur rôle dans la régulation de la synthèse des ARN, comme le montrent des expériences comportant un changement de milieu en cours de germination. Immédiat, cet effet, des acides aminés s'observe d'ailleurs même en présence de chloramphénicol.

3° L'étude cinétique précise de la synthèse des ARN en présence de chloramphénicol suggère que les spores sont dépourvues d'une protéine, présumée ribosomale, intervenant dans la synthèse — ou la stabilisation — des ARN ribosomaux, protéine qui serait synthétisée préférentiellement au début de la germination. L'hypothèse

d'après laquelle les ribosomes interviendraient dans la synthèse des trois types d'ARN, permet de rendre compte à la fois de l'allure autocatalytique de la synthèse de ces ARN et des proportions constantes de leur taux de synthèse.

En résumé, les spores sont caractérisées par l'absence d'ARN messagers et, relativement aux formes végétatives, par leur pauvreté en ribosomes et en enzymes formateurs d'acides aminés.

★
★ ★

Nous remercions MM. P. Schaeffer, F. Gros et A. Kepes pour de nombreuses critiques et suggestions et M^{lle} A. Malhié pour sa collaboration technique.

SUMMARY

SYNTHESIS OF MACROMOLECULES DURING GERMINATION.

II. — REGULATION.

A study of the regulation of RNA and protein synthesis during germination has led to the following conclusions :

1° Amino acids are required, even by a prototrophic strain, in order that the active phase of germination may proceed normally. In the absence of amino acids a slow turnover of RNA and protein takes place but germination does not continue beyond the initial phase.

2° The requirement for amino acids during germination is explained by their role in the regulation of RNA synthesis. This is shown by both shift-up and shift-down experiments. The amino acid effect which is immediate is observed even in the presence of chloramphenicol.

3° A detailed kinetic study of RNA synthesis in the presence of chloramphenicol suggests the spore lacks a protein ; presumably ribosomal protein which is involved in the synthesis or the stabilisation of ribosomal RNA and which is synthesised preferentially at the beginning of germination. The hypothesis that the ribosomes play a role in the synthesis of all three types of RNA provides an explanation both for the autocatalytic rate of synthesis of these RNAs and for the constancy of their relative rates of formation.

In summary the spore is characterised by the absence of messenger RNA, and by its small content, relative to the vegetative form, of ribosomal protein, ribosomes, and amino acid synthesising enzymes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALFÖLDI (L.), STENT (G. S.), HOOGS (M.) and HILL (R.). *Z. Vererbungsl.*, 1963, **94**, 285.
- [2] BALASSA (G.). *Mécanismes de régulation chez les microorganismes*, 124^e Colloque du C. N. R. S. 1963. Ed. C. N. R. S. 1965. p. 565.
- [3] BALASSA (G.). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1964, **15**, 236.
- [4] BALASSA (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1966, **110**, n° de janvier.
- [5] BALASSA (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1965, **109**, 683.
- [6] BREMER (H.) and KONRAD (M. W.). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1964, **51**, 801.
- [7] BYRNE (R.), LEVIN (J. G.), BLADEN (H. A.) and NIRENBERG (M. W.). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1964, **52**, 140.
- [8] DAGLEY (S.), WHITE (A. E.), WILD (D. G.) and SYKES (J.). *Nature*, 1962, **194**, 25.
- [9] DEMAÏN (A. L.). *J. Bacteriol.*, 1958, **75**, 517.
- [10] GROS (F.), NAONO (S.), DUBERT (J. M.), ATTARDI (G.) et JACOB (F.). *Mécanismes de régulation chez les microorganismes*, 1963, 124^e Symp. C. N. R. S., p. 14., édit., C. N. R. S. 1965.
- [11] GROS (F.), NAONO (S.), ROUVIERE (J.), HAYES (D.) et CUKIER (R.). *Eur. Congr. Biochem. Vienna*, 1965, sous presse.
- [12] KJELDGAARD (N. O.) and KURLAND (C. G.). *J. Mol. Biol.*, 1963, **6**, 204.
- [13] KURLAND (C. G.) and MAALØE (O.). *J. Mol. Biol.*, 1962, **4**, 193.
- [14] LEVINSON (H. S.) and HYATT (M. T.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1963, **102**, 773.
- [15] MANDEL (L. R.) and BOREK (E.). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1962, **9**, 11.
- [16] MCCARTHY (B. J.). *Biochim. Biophys. A.*, 1962, **55**, 880.
- [17] MURRELL (W. G.). *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 1961, **11**, 100.
- [18] NEIDHARDT (F. C.). *Progress in Nucleic Acid Res.*, 1964, **3**, 145.
- [19] NEIDHARDT (F. C.) and EIDLIC (L.). *Biochim. Biophys. A.*, 1963, **68**, 380.
- [20] NEIDHARDT (F. C.) and FRAENKEL (D. G.). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1961, **26**, 63.
- [21] NEIDHARDT (F. C.) and GROS (F.). *Biochim. Biophys. A.*, 1957, **25**, 513.
- [22] NOMURA (M.) and WATSON (J. D.). *J. Mol. Biol.*, 1959, **1**, 204.
- [23] O'BRIEN (R. T.) and CAMPBELL (L. L.). *J. Bacteriol.*, 1957, **73**, 522.
- [24] STENT (G. S.). *Science*, 1964, **144**, 816.
- [25] WOESE (C. R.). *J. Bacteriol.*, 1959, **77**, 690.
- [26] WOESE (C. R.). *J. Bacteriol.*, 1961, **82**, 695.
- [27] WOESE (C. R.), LANGRIDGE (R.) and MOROWITZ (H. J.). *J. Bacteriol.*, 1960, **79**, 777.

SYNTHÈSE ET FONCTION DES ARN MESSAGERS AU COURS DE LA SPORULATION DE *BACILLUS SUBTILIS*

par G. BALASSA

(Service de Physiologie Microbienne,
Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris)

INTRODUCTION

La sporulation des bacilles est un exemple de différenciation cellulaire chez des bactéries ; elle est, en tant que telle, étudiée aux points de vue cytologique, physiologique, génétique et biochimique [22, 6]. Elle n'a lieu qu'en absence de croissance et s'accompagne d'un renouvellement considérable d'ARN et de protéines [12, 18, 26, 27]. La formation de protéines nouvelles, spécifiques de la sporulation (revue dans [43]) semble requérir la synthèse d'ARN messagers pendant la sporulation ; cette synthèse a été mise en évidence expérimentalement [3, 11, 23].

Il est depuis longtemps admis que des ARN jouent un rôle particulier dans la différenciation cellulaire. Le développement récent de nos connaissances sur les diverses fractions d'ARN a conduit à la construction de modèles théoriques, faisant intervenir l'ARN messager par deux mécanismes. Le premier, formulé par Monod et Jacob [17], suppose que des signaux provoquent la différenciation en agissant sur la synthèse d'*ARN messagers instables*, par un mécanisme analogue à celui de l'induction de la β -galactosidase, tandis que le second est fondé sur la *stabilisation* de certains *ARN messagers spécifiques*, permettant la synthèse continue de protéines déterminées, même en absence de synthèse d'ARN [comme cela peut être observé chez les réticulocytes] (références dans Moldave [46]).

Pour rechercher lequel de ces modèles s'applique le mieux à la sporulation, nous avons étudié d'une part la synthèse et la dégradation des ARN à marquage rapide au cours de la sporulation, d'autre part l'effet des inhibiteurs spécifiques de la synthèse des ARN et des protéines sur le développement des résistances caractéristiques de la spore.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MILIEUX. — Le milieu de sporulation a été décrit ailleurs [22, 4]. Le même milieu, contenant 1,5 p. 100 de gélose a été utilisé par les numérations.

SPORULATION DES CULTURES. — Des cultures du mutant Ind⁻168 (requérant l'indole) de *Bacillus subtilis*, en croissance exponentielle depuis au moins douze générations, sont préparées à partir de bactéries conservées à -20°C dans un milieu contenant du glycérol à 20 p. 100. Des prélèvements sont faits, additionnés d'aldéhyde formique pour 3 p. 100, et leur densité optique est mesurée à 420 m μ ; le temps zéro de la sporulation (t_0) est déterminé sur les courbes de densité optique : c'est le temps où la croissance cesse d'être exponentielle [22]. Si nécessaire, le nombre de cellules viables est déterminé après t_0 par étalement sur milieu gélosé. La sporulation des cultures est contrôlée, dans chaque expérience, après sept ou vingt heures d'incubation, au microscope optique.

NUMÉRATION DES SPORES. — Le nombre des spores, résistantes à l'octanol, au chloroforme, ou au chauffage, est déterminé par étalement sur gélose nutritive de cultures, agitées pendant cinq minutes à la température ambiante avec une goutte d'octanol, ou de chloroforme, ou chauffées dix minutes à 80° .

Dans les expériences cinétiques, il a parfois été nécessaire de conserver les cultures pendant plusieurs jours, pour ne procéder aux numérations précises qu'après détermination des dilutions convenables. Des échantillons ont donc été immédiatement dilués dans un milieu refroidi contenant 20 p. 100 de glycérol, et congelés à -20° , les traitements et les étalements étant faits les jours suivants. Toutes les spores résistantes à l'octanol, au chloroforme ou au chauffage sont conservées viables dans ces conditions. Il a été vérifié d'autre part que l'addition au milieu complexe, pendant la croissance ou à t_1 , d'uracile (10^{-2}M), de valine (10^{-2}M), ou de tout autre acide aminé (100 $\mu\text{g/ml}$), n'inhibe pas la sporulation de la culture.

Lorsque les spores devaient être comptées dans une culture contenant un antibiotique, on s'est assuré que la dilution de celui-ci après l'étalement sur le milieu solide était suffisante pour n'inhiber la formation d'aucune colonie. Cette condition était spontanément réalisée pour le chloramphénicol; elle ne l'était pour l'actinomycine que dans les tests de résistance à l'octanol ou au chloroforme qui extraient l'antibiotique; dans les cultures chauffées, celui-ci était extrait avant l'étalement par une goutte de chloroforme.

MÉTHODES BIOCHIMIQUES. — Les produits employés et la mesure de l'incorporation des précurseurs radioactifs ont été décrits précédemment [5]. Les deux antibiotiques sont utilisés à la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$. Il a été vérifié que l'uracile et la valine radioactifs s'incorporent tout au long de la sporulation, et que l'actinomycine et le chloramphénicol, respectivement, inhibent à tout instant cette incorporation.

RÉSULTATS

1° CINÉTIQUE DE LA SPORULATION. — Avant d'aborder l'étude de l'effet des inhibiteurs sur la synthèse des ARN et la formation des spores, il importe de décrire la sporulation normale, telle qu'on l'observe chez *B. subtilis* dans nos conditions de culture. Cette description, donnée ailleurs [22, 20], ne sera ici que brièvement résumée, en insistant cependant sur l'apparition des diverses résistances de la spore.

A 37° dans un milieu complexe bien aéré, *B. subtilis* pousse exponentiellement et avec un temps de doublement de 30 min., jusqu'à une densité optique, à 420 m μ , de 4,0 à 5,0, correspondant à $5 \cdot 10^8$ bactéries/ml, et sporule à une fréquence (définie comme le nombre des spores à t_{20} , divisé par le nombre de bactéries viables à t_1) qui varie généralement entre 50 et 80 p. 100. (Dans certaines expériences, au-dessus de d.o. 1,0, la croissance se ralentit, pour une raison inconnue, et le temps de doublement atteint 1 heure; même alors la sporulation se fait normalement, t_0 correspondant toujours à une densité optique de 4,0 à 5,0.)

Les premiers signes morphologiques de la sporulation apparaissent chez la majorité des bactéries moins d'une heure après l'arrêt de la croissance [20]; la sporulation semble donc commencer très rapidement après l'arrêt de la croissance exponentielle, ce qui justifie la définition de t_0 . Les temps de sporulation sont exprimés en heures après t_0 (p. ex. $t_7 = 7$ heures après l'arrêt de la croissance ou 7 heures de sporulation). On peut déterminer t_0 sur les courbes de croissance avec une marge d'erreur d'environ 30 min. Après t_0 , six étapes morphologiques se succèdent jusqu'à l'apparition des spores mûres [11, 20]; dès la troisième, soit vers t_2 , la *présore* est formée, incluse dans le *sporange*, la bactérie est donc devenue un *organisme bicellulaire*, à deux cellules morphologiquement différentes.

L'apparition des spores résistantes à l'octanol (O^R), commence environ 3,0-3,5 heures après t_0 et continue avec une cinétique proche de l'exponentielle [on observe parfois une cassure de la courbe] (fig. 1, voir aussi [22]). Pendant cette période, le nombre de spores augmente de dix fois en moins de 20 minutes. Quand environ 50 p. 100 des spores O^R sont déjà formées, la pente de la courbe diminue et des spores résistantes continuent à apparaître lentement jusqu'à 20 heures. Les courbes correspondantes, représentant le nombre des spores résistantes au chloroforme (C^R) et au chauffage (T^R) sont parallèles à la courbe précédente. Environ 1 heure est nécessaire pour qu'une spore O^R devienne T^R . La résistance au chloroforme

se manifeste toujours entre l'apparition des deux autres résistances, mais la courbe correspondante peut se situer, selon l'expérience, plus près de l'une ou l'autre des deux autres courbes. Malgré ces variations, l'ordre d'apparition des résistances ne laisse aucun doute, et entre t_3 et $t_{5,5}$, les spores CR et TR représentent un dixième et un centième, respectivement, des spores OR .

L'apparition de la résistance à l'octanol coïncide avec celle de la

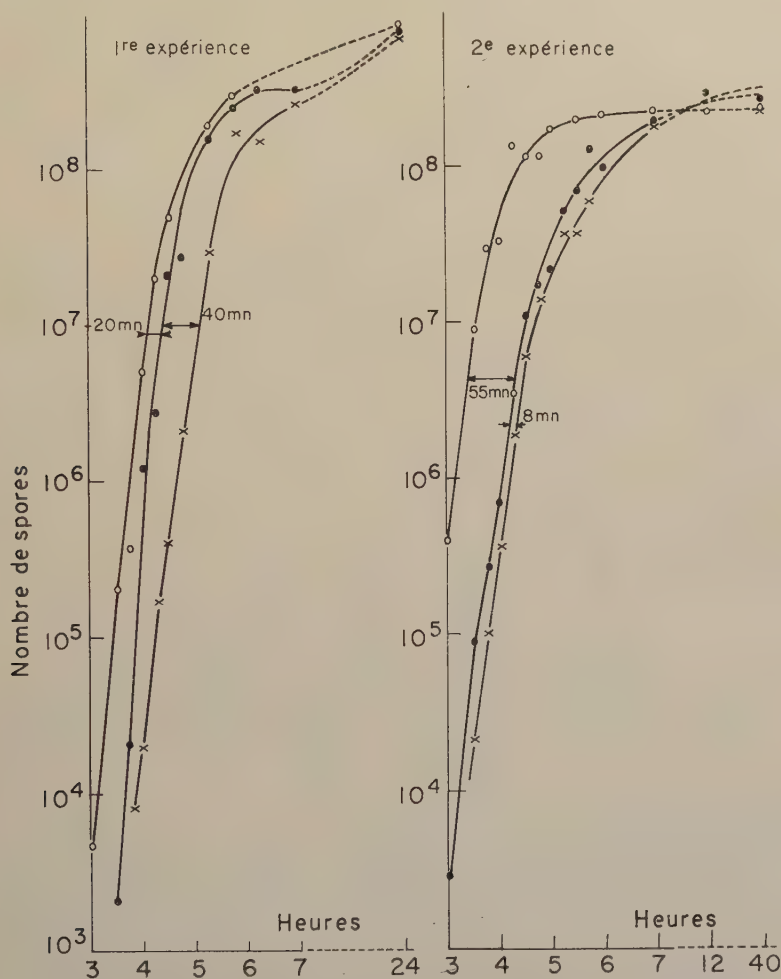


FIG. 1. — Apparition des résistances au cours de la sporulation.

Nombre de spores résistantes à l'octanol (—○—), au chloroforme (—●—)
et au chauffage (—×—).

réfringence ; celle de la thermorésistance est accompagnée de deux changements visibles : l'épaississement du cortex (probablement par accumulation de matériel cortical [25]), et la formation de la tunique externe [20], composée de protéines.

Les cinétiques précédentes montrent que la formation des spores n'est jamais parfaitement synchrone dans la population ; l'hétérogénéité apparaît déjà avant l'apparition de la résistance à l'octanol. D'après les observations au microscope électronique [20], le degré de synchronisme est approximativement le même pendant les étapes précoces et au moment de l'apparition des résistances. Il semble donc que la durée de la sporulation soit la même chez toutes les bactéries, mais qu'elle puisse se déclencher plus ou moins tôt après t_0 . La période t_0 - t_1 correspond donc essentiellement au déclenchement de la sporulation, dont la cinétique est reflétée, plusieurs heures plus tard, par celle de l'apparition des résistances.

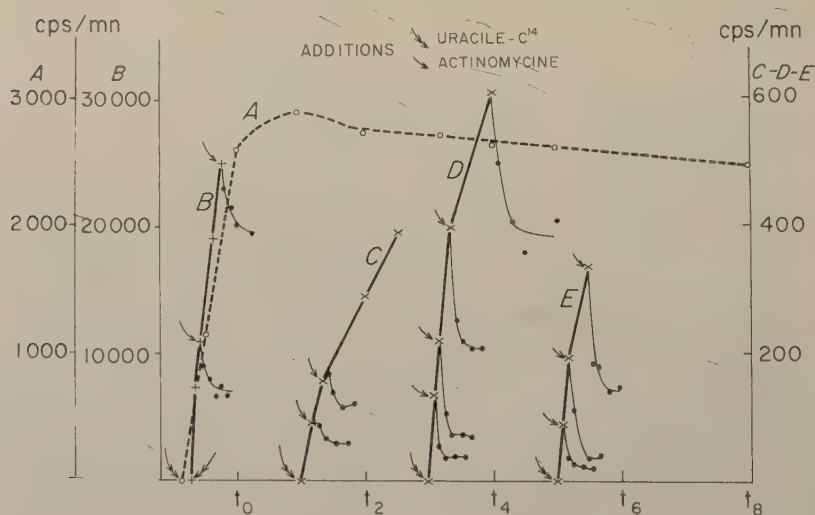


FIG. 2. — Synthèse d'ARN stables et instables.

De l'uracile- ^{14}C ($0,5 \mu\text{Ci/ml}$, $5 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) est ajouté à des temps variés de la sporulation. Son incorporation et la dégradation, en présence d'actinomycine, d'ARN synthétisés sont suivies. La première culture (A) contient également un excès d'uracile froid ($2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$), elle permet de suivre la synthèse nette d'ARN. D'après Balassa [3].

2° SYNTHÈSE DES ARN MESSAGERS. — Nous avons rappelé qu'un renouvellement important des ARN et des protéines a lieu pendant toute la durée de la sporulation, en absence de synthèse nette. Pour savoir si des ARN messagers instables sont synthétisés au

cours de ce renouvellement, nous avons étudié la stabilité métabolique, en présence d'actinomycine, des ARN à marquage rapide [15].

L'uracile- ^{14}C s'incorpore dans l'ARN des bactéries à tout instant pendant la sporulation. Si son incorporation est arrêtée par l'addition d'actinomycine, une partie de la radioactivité incorporée devient acidosoluble, il y a donc synthèse continue d'une fraction d'ARN métaboliquement instable (fig. 2). La figure 3 montre que cette

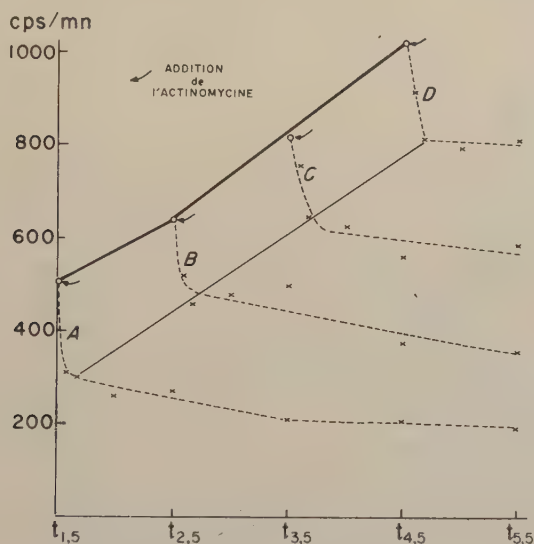


FIG. 3. — Accumulation des ARN stables.

De l'uracile- ^{14}C ($0,50 \mu\text{Ci/ml}$) est ajouté à $t_{0,25}$. Aux temps indiqués, une portion de la culture est additionnée d'actinomycine et la dégradation des ARN mesurée (---). Le trait épais continu indique l'accumulation des ARN totaux, le trait fin montre celle des ARN, stables en présence d'actinomycine. D'après Balassa [3].

fraction est constante tandis que l'activité spécifique de la fraction stable augmente continuellement lorsque les bactéries sporulent en présence d'uracile- ^{14}C . La *demi-vie* de la fraction instable est d'environ 1,5 min., elle est donc la même que chez des bactéries en phase végétative. Les ARN instables contiennent, après un marquage de 2 min., 60 p. 100 de radioactivité incorporée (fig. 4), ce chiffre est obtenu à tous les stades de la sporulation ainsi que chez des bactéries en croissance.

Enfin, la quantité d'*ARN messenger fonctionnel*, présente dans la cellule, peut être mesurée par la capacité de la cellule à synthétiser des protéines en présence d'actinomycine. L'incorporation de la valine- ^{14}C , ajoutée en même temps que l'actinomycine, mesure cette capacité (exprimée en radioactivité incorporée par minute). La figure 5 montre qu'elle diminue à la même vitesse que la fraction d'ARN instable : les résultats sont ici encore les mêmes, que les bactéries soient étudiées en croissance exponentielle [15] ou pendant la sporulation.

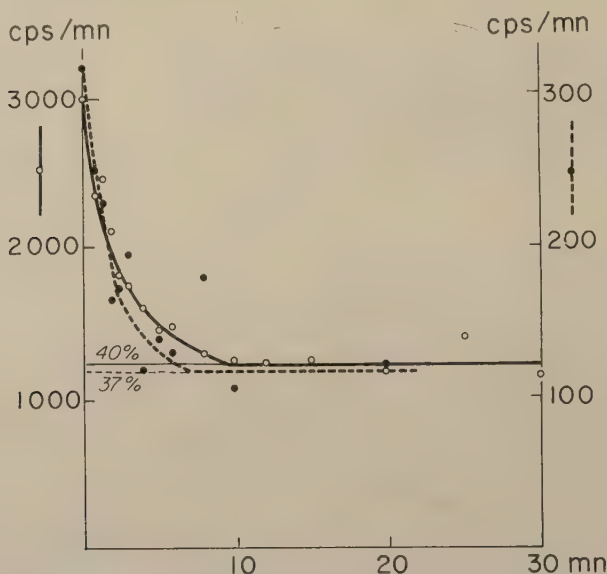


FIG. 4. — Dégradation des ARN messagers.

Des bactéries en croissance exponentielle (—○—) et pendant la sporulation (à t_3 , ---●---) sont marquées pendant deux minutes à l'uracile- ^{14}C , puis de l'actinomycine est ajoutée et l'on mesure la radioactivité acido-insoluble.

3° EFFET DE L'ACTINOMYCINE ET DU CHLORAMPHÉNICOL SUR L'APPARITION DES SPORES RÉSISTANTES. — Les expériences précédentes montrent que des ARN instables sont formés tout au long de la sporulation et qu'ils sont requis pour les synthèses protéiques. Elles ne prouvent cependant pas que ces ARN messagers soient indispensables au développement de la spore. L'étude de l'effet de l'actinomycine sur la sporulation devrait donner une réponse à cette question, cependant des résultats contradictoires ont été obtenus. Chez *B. subtilis*, l'addition, même tardive, d'actinomycine ou de chloramphénicol inhibe complètement l'apparition des spores réfrin-

gentes [3, 24]. La synthèse des ARN et des protéines semble donc nécessaire à la sporulation. Des observations morphologiques, faites par Fitz-James [11] sur *B. cereus*, et par Ryter et Szulmajster [21] sur *B. subtilis*, ont également montré que le développement de la spore est inhibé, à tous les stades, par l'un et l'autre des antibiotiques ; seul l'épaississement du cortex, qui coïncide normalement avec l'apparition de la thermorésistance, échappe à cette inhibition ; par contre, la formation de la tunique externe, qui se fait en même

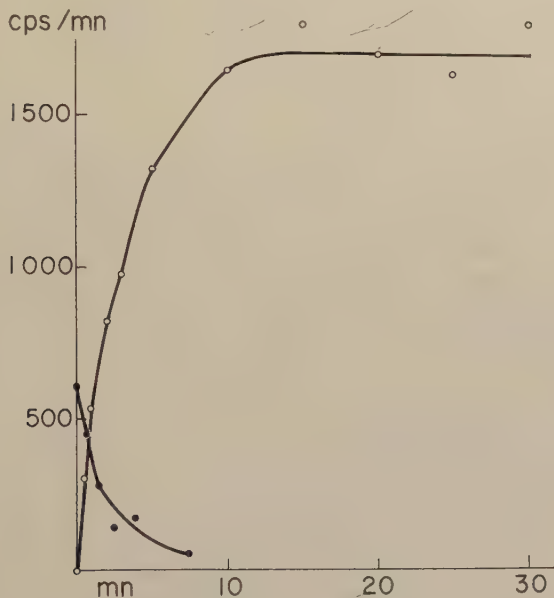


FIG. 5. — Synthèse des protéines en présence d'actinomycine.

La valine-¹⁴C et l'actinomycine sont ajoutées ensemble à des bactéries à t_{25} . Les courbes représentent l'incorporation de la valine dans les protéines (—○—) et le taux de synthèse momentané des protéines (radioactivité incorporée par minute, —●—).

temps, est inhibée, ce qui entraîne l'apparition de spores anormales, thermorésistantes, mais défectueuses dans leurs enveloppes externes. Cependant, Del Valle et Aronson [7] ont trouvé que l'apparition de spores thermorésistantes de *B. cereus*, sensible au chloramphénicol pendant toute la sporulation, n'est inhibée que par l'addition très précoce d'actinomycine. Devant ce désaccord, nous avons suivi comparativement l'apparition des résistances à l'octanol, au

chloroforme et au chauffage, en présence de chloramphénicol ou d'actinomycine.

Dans des cultures ayant reçu de l'actinomycine ou du chloram-

TABEAU I. — Effet de l'addition précoce des antibiotiques sur la sporulation.

Antibiotiques ajoutés à t_1 .

TEMPS DU PRÉLÈVEMENT	NOMBRE DE SPORES PAR MILLILITRE					
	OR		CR		TR	
	AM	CM	AM	CM	AM	CM
t_1	0		0		0	
t_5	0	0	0	0	0	0
t_7	0	2.10^3	0	0	0	0

L'apparition des résistances dans la culture témoin est représentée figure 1. OR, spores résistantes à l'octanol; CR, au chloroforme; TR, au chauffage. AM, culture contenant de l'actinomycine; CM, du chloramphénicol.

0, moins de 10^3 spores/ml.

Des résultats identiques ont été obtenus dans une expérience où les antibiotiques ont été ajoutés à t_2 .

TABEAU II. — Apparition des résistances après addition tardive des antibiotiques.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE.

Antibiotiques ajoutés à t_{10} .

TEMPS DU PRÉLÈVEMENT	NOMBRE DE SPORES PAR MILLILITRE					
	OR		CR		TR	
	AM	CM	AM	CM	AM	CM
t_4	5.10^6		$1,2.10^6$		2.10^4	
$t_{4,25}$	5.10^6	$2,5.10^6$	2.10^6	1.10^6	2.10^4	$1,5.10^4$
$t_{4,5}$	$1,2.10^7$	$1,1.10^7$	3.10^6	4.10^6	8.10^4	$1,7.10^6$
t_5	$2,2.10^7$	$5,4.10^6$	$1,1.10^7$	$7,6.10^6$	5.10^6	$7,1.10^6$
t_7	$6,5.10^7$	$1,0.10^7$	$4,3.10^7$	$9,0.10^6$	$3,8.10^7$	$5,7.10^6$
t_{24}	$4,0.10^7$	$1,8.10^6$	$4,6.10^7$	$1,3.10^6$	$3,0.10^7$	2.10^6

DEUXIÈME EXPÉRIENCE.

A. Antibiotiques ajoutés à t_3 .

TEMPS DU PRÉLÈVEMENT	O ^R		C ^R		T ^R	
t ₃	4.10 ⁵		3.10 ³		o	
	AM	CM	AM	CM	AM	CM
t _{3,5}	—	—	4.10 ⁴	6,3.10 ⁴	1,5.10 ³	2,8.10 ⁴
t ₅	1,6.10 ⁵	8.10 ⁵	3,5.10 ⁴	2,9.10 ⁵	3,2.10 ⁴	1,2.10 ⁵
t ₇	6,2.10 ⁴	1,8.10 ⁵	2,1.10 ⁴	1,5.10 ⁵	1,9.10 ⁴	1,8.10 ⁵

Explication des signes : voir tableau I.

B. Antibiotiques ajoutés à t_{35} .

TEMPS DU PRÉLEVEMENT	O ^R		C ^R		T ^R	
t _{3,5}	9.10 ⁶		9.10 ⁴		2.10 ⁴	
	AM	CM	AM	CM	AM	CM
t _{3,75}	4,4.10 ⁶	1,4.10 ⁷	2,3.10 ⁵	1,0.10 ⁵	7,3.10 ³	3,4.10 ⁴
t ₁	2,3.10 ⁷	3,1.10 ⁷	3,0.10 ⁵	7,0.10 ⁵	1,8.10 ⁴	4,0.10 ⁵
t ₇	2,4.10 ⁸	7,3.10 ⁸	1,5.10 ⁶	5,6.10 ⁶	6,6.10 ⁵	5,0.10 ⁶

C. Antibiotiques ajoutés à t_4 0.

TEMPS DU PRÉLÈVEMENT	O ^R		C ^R		T ^R	
t ₄	3,4.10 ⁷		7,0.10 ⁵		3,7.10 ⁵	
	AM	CM	AM	CM	AM	CM
t _{4,25}	7,6.10 ⁷	4,8.10 ⁷	2,8.10 ⁶	2,9.10 ⁶	2,3.10 ⁵	9,2.10 ⁵
t _{4,5}	1,3.10 ⁸	1,0.10 ⁸	7,9.10 ⁶	9,3.10 ⁶	1,8.10 ⁶	5,0.10 ⁶
t ₈	7,0.10 ⁷	1,3.10 ⁸	4,6.10 ⁶	8,1.10 ⁷	3,8.10 ⁷	4,3.10 ⁷
t ₇	1,5.10 ⁷	2,0.10 ⁷	1,8.10 ⁷	—	1,6.10 ⁷	2,2.10 ⁶

Explication des signes : voir tableau I.

phénicol avant t_3 , l'apparition des spores OR (et, *a fortiori*, des spores CR et TR) est complètement inhibée (tableau I). Lorsque, par contre, l'un de ces antibiotiques est ajouté à t_3 ou plus tard, quand les spores OR commencent à apparaître, les résultats sont bien différents (tableau II et fig. 6) : le nombre des spores OR continue à augmenter pendant un certain temps, puis passe par un plateau, et enfin diminue. L'augmentation observée, toujours faible (de deux, plus rarement de dix fois), se ferait dans la culture témoin en moins de dix minutes. Cette cinétique est la même, quel que soit l'antibiotique ajouté, cependant la diminution finale est plus rapide en présence de chloramphénicol. Par contre, le nombre de spores CR et TR augmente régulièrement, quel que soit l'antibiotique ajouté, et atteint finalement le nombre de spores OR ; cette augmentation semble plus lente que dans la culture témoin. Par la suite, le nombre de spores, désormais résistantes aux trois agents utilisés, subit une diminution lente.

L'interprétation des résultats est rendue délicate par le fait qu'une fraction souvent importante des préspores et même des spores thermorésistantes meurent en présence d'antibiotique. On sait que des cultures de *B. subtilis* subissent facilement une autolyse dans des conditions défavorables, et une forte lyse des cultures a en effet été observée dans ces expériences pendant l'incubation avec un antibiotique. La lyse des spores OR peut être attribuée soit à leur propre autolyse, soit à leur sensibilité aux substances lytiques libérées des bactéries. Plus surprenante est la mort d'un nombre de spores thermorésistantes, formées en présence d'antibiotique. D'après des expériences témoins, les spores normales survivent parfaitement à la longue incubation en présence de chloramphénicol ou d'actinomycine. Seules les spores, dont le développement s'est terminé en présence d'antibiotique, subissent facilement une lyse. Cette lyse est d'ailleurs plus prononcée en présence de chloramphénicol qu'en présence d'actinomycine ; un dénombrement tardif donnerait donc une idée fausse de l'action de ces antibiotiques sur la sporulation. Les courbes obtenues correspondent à la superposition de la cinétique de la maturation des spores pendant le traitement par l'antibiotique à celle de la lyse des préspores. Malgré cette complication, deux faits apparaissent clairement :

1° *L'apparition des spores OR est également inhibée par les deux antibiotiques utilisés.* Cette inhibition n'est pas immédiate, une augmentation initiale des spores OR a généralement lieu.

2° *La majorité, sinon la totalité des spores OR sont capables de continuer leur maturation jusqu' à la thermorésistance* en présence de l'un ou l'autre des antibiotiques, permettant l'augmentation du nombre des spores CR et TR par un facteur de 10 à 1 000. Les spores ainsi formées restent cependant sensibles à la lyse.

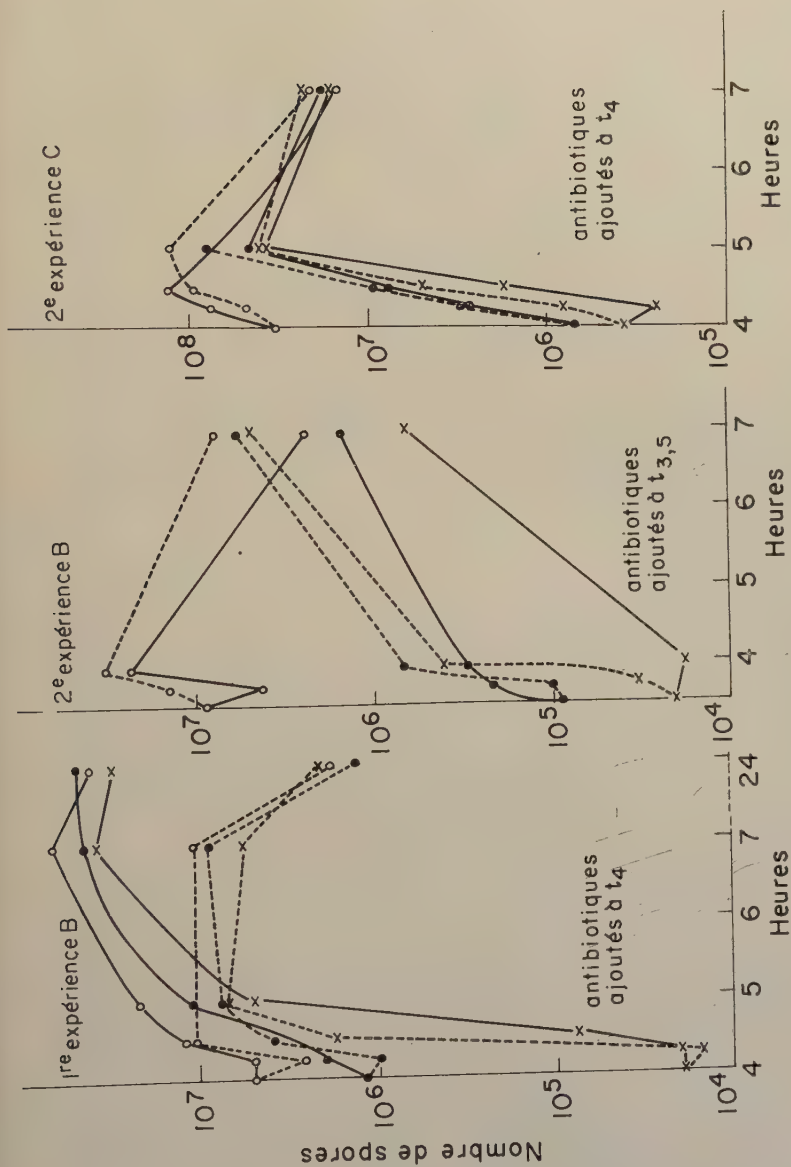


FIG. 6. — Effet des antibiotiques sur la sporulation.

Le nombre de spores, résistantes à l'octanol (○), au chloroforme (●) et au chauffage (×) est mesuré au cours de l'incubation en présence d'actinomycine (—) ou de chloramphénicol (---).

DISCUSSION

Les expériences décrites prouvent que des *ARN messagers instables* sont formés au cours de la sporulation. L'examen des extraits bruts [23] et des ARN purifiés (Balassa, résultats inédits) des bactéries rapidement marquées à l'uracile- ^{14}C ou au ^{32}P , effectué soit par centrifugation en gradient de saccharose, soit par chromatographie sur albumine méthylée [8] ont abouti aux mêmes conclusions ; le profil de sédimentation ou d'élution des ARN marqués ressemble à celui des ARN messagers des cellules végétatives.

En présence d'actinomycine, la vitesse de dégradation des ARN messagers est la même pendant la sporulation et pendant la croissance ; on n'observe aucune fraction instable à vie plus longue. Cette demi-vie est donc constante tout le long du cycle sporal [5] : elle est par ailleurs indépendante des conditions de croissance et dépend uniquement de la température [10]. Le rapport des vitesses de synthèse des fractions stables et instables est également constant dans le cycle sporal.

La formation d'ARN messagers instables n'exclut pas nécessairement l'existence d'*ARN messagers stables*. Cependant, la synthèse des protéines dépend apparemment des seuls ARN instables : l'actinomycine inhibe, pendant toute la sporulation, la synthèse des protéines à plus de 95 p. 100. Des ARN messagers stables, s'ils existent, n'interviennent donc pas dans la synthèse de la majorité des protéines au cours de la sporulation. De même, aucune évidence de l'existence de tels ARN dans la spore ou au cours de la germination n'a pu être obtenue [4, 5, 8, 14]. La possibilité subsiste cependant qu'un ARN messenger stable intervienne spécifiquement dans la formation, en faibles quantités, de protéines, spécifiques d'une étape quelconque de la sporulation.

On ne connaît pas d'autre effet primaire du chloramphénicol et de l'actinomycine que l'inhibition de la synthèse des protéines et des ARN, respectivement. Un effet indirect, dû au renforcement de la répression catabolique [19] n'est pas exclu, mais il est insuffisant pour expliquer toutes les observations. L'inhibition absolue de la sporulation par l'actinomycine ou le chloramphénicol (ajoutés avant l'apparition des spores OR) indique donc que la synthèse des protéines, déterminée par des ARN messagers instables, est indispensable aux réactions mêmes tardives que requiert la formation des spores. (La seule exception, l'apparition de la thermorésistance, qui se passe de synthèse protéique, n'entre pas dans cette discussion et sera considérée plus loin.)

En conclusion, nous admettons *qu'à aucun moment du cycle sporal il n'y a formation d'ARN messagers stables*. Remarquons

cependant que tous nos arguments sont basés sur l'emploi d'une seule méthode : l'inhibition de la synthèse des ARN par l'actinomycine ; d'autre part, ces arguments n'excluent pas la possibilité, peu vraisemblable, que de faibles quantités d'ARN messagers stables soient présents et interviennent à un point quelconque du cycle sporal, mais leur fonctionnement n'est pas décelable lorsque l'on empêche la synthèse des ARN messagers instables. Notre conclusion est en désaccord total avec celles de Del Valle et Aronson [2, 7] qui décrivent chez *Bacillus cereus* des étapes de sporulation résistantes aux analogues de bases et à l'actinomycine. Ce désaccord pourrait s'expliquer par la différence d'espèce ou par des raisons techniques : nous avons décrit une lyse plus rapide des spores formées en présence de chloramphénicol, aboutissant à l'apparence d'un effet différentiel des deux antibiotiques (1).

L'étape précédant la thermorésistance mérite une discussion particulière. L'apparition des spores O^R est arrêtée, après une augmentation initiale, aussi bien par le chloramphénicol que par l'actinomycine. Cette augmentation initiale (correspondant à un délai de moins de dix minutes dans l'action de l'antibiotique) peut être attribuée au temps nécessaire à la formation des chaînes polypeptidiques, à leur polymérisation éventuelle et à leur incorporation dans la structure sporale.

La maturation des spores O^R en spores C^R puis T^R se fait, par contre, en présence des antibiotiques utilisés (plus lentement, il est vrai, que dans la culture témoin). Puisque les précurseurs radioactifs s'incorporent dans la préspore même à ce stade de la sporulation et que les antibiotiques inhibent cette incorporation, il faut conclure que l'apparition de la thermorésistance ne requiert ni la synthèse d'ARN ni celle de protéines. Cette maturation doit correspondre, comme l'indiquent d'ailleurs les études cytologiques déjà citées, non pas à la formation de la tunique externe protéique, inhibée par les antibiotiques, mais au développement du cortex, c'est-à-dire vraisemblablement, à l'accumulation de l'acide dipicolinique, du calcium et autres substances non protéiques. Il est parfaitement concevable que ce développement se fasse par l'action d'enzymes, déjà synthétisés lors de l'apparition de spores O^R . Dans cette interprétation, la maturation ralentie des spores s'expliquerait par les quantités faibles de ces enzymes, présents lors de l'addition d'antibiotique.

Nous avons vu qu'il est possible de dissocier la résistance à la lyse de la thermorésistance, la première étant apparemment liée à la tunique externe, la seconde au cortex. On peut prévoir l'exis-

(1) Le même désaccord persiste dans les conclusions des expériences d'hybridation d'ARN et d'ADN dénaturé, faites par Doi et Igarashi [9] chez *B. subtilis* et par Aronson [4], chez *B. cereus*.

tence de mutants chez lesquels les spores ne pourraient acquérir qu'une seule de ces deux résistances; de tels mutants n'ont, cependant, pas encore été décrits chez *B. subtilis*.

Il est à remarquer qu'un renouvellement important des ARN et des protéines a lieu même à des stades tardifs de la sporulation. Ce renouvellement n'est pas requis pour l'apparition de la thermorésistance, par contre, il joue certainement un rôle important dans la synthèse de certains constituants sporaux (tunique extérieure, pigment brun, etc.).

RÉSUMÉ

Tout au long de la sporulation, des ARN messagers métaboliquement instables sont synthétisés. La demi-vie de ces ARN (environ 1,5 min.) est la même que pendant la croissance, elle reste donc constante pendant tout le cycle sporal. La capacité des bactéries à synthétiser des protéines dépend de ces ARN instables.

A la fin de la sporulation, les résistances à l'octanol, au chloroforme et à la chaleur apparaissent dans cet ordre, à 15 min. d'intervalle. Aux concentrations inhibitrices des synthèses, l'actinomycine et le chloramphénicol inhibent toutes les étapes de la sporulation, sauf le passage final de l'octanol-résistance à la thermorésistance: seule cette dernière étape ne requiert ni synthèse d'ARN ni synthèse de protéines.

En conclusion, les expériences biochimiques et l'étude de l'effet des inhibiteurs sur l'apparition des résistances sporales montrent l'intervention d'ARN messagers instables dans la sporulation. Nous n'avons pu déceler la présence d'aucun ARN messenger stable.

SUMMARY

THE SYNTHESIS AND FUNCTIONING OF MESSENGER RNA DURING SPORULATION OF *Bacillus subtilis*.

Throughout sporulation, metabolically unstable messenger RNA is synthesised. The half life of this messenger RNA (1.5 min.) is constant during the whole spore cycle: growth, sporulation and germination.

At the end of sporulation resistance to octanol, chloroform, and heat appear in that order at 15 min. intervals. Actinomycine and chloramphenicol, at concentrations sufficient to inhibit RNA or protein synthesis, inhibit all stages of sporulation except the final phase in which the octanol resistant spores become heat resistant.

Hence this last step requires synthesis neither of RNA nor of protein.

In conclusion the study of the effect of inhibitors on the progress of sporulation (appearance of spore resistances), and the results of biochemical experiments show that unstable messenger RNAs are involved in sporulation. The presence of stable messenger RNA has not been demonstrated.

*
**

Je remercie MM. F. Gros et P. Schaeffer pour de nombreuses discussions.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ARONSON (A. I.). *J. Mol. Biol.*, 1965, **11**, 576.
- [2] ARONSON (A. I.) and DEL VALLE (M. R.). *Biochim. Biophys. A.*, 1964, **87**, 267.
- [3] BALASSA (G.). *Biochim. Biophys. A.*, 1963, **76**, 410.
- [4] BALASSA (G.). *Ann. Institut Pasteur*, 1966, **110**, n° de janvier.
- [5] BALASSA (G.). *Ann. Institut Pasteur*, 1965, **109**, 683.
- [6] CAMPBELL (L. L.) and HALVORSON (H. O.). Ed. *Spores III.*, *Amer. Soc. Microbiol.*, 1965.
- [7] DEL VALLE (M. R.) and ARONSON (A. I.). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1962, **9**, 421.
- [8] DOI (R. H.) and IGARASHI (R. T.). *J. Bacteriol.*, 1964, **87**, 323.
- [9] DOI (R. H.) and IGARASHI (R. T.). *Proc. Nat. Ac. Sci.*, 1964, **52**, 755.
- [10] FAN (D. P.), HIGA (A.) and LEVINthal (C.). *J. Mol. Biol.*, 1964, **8**, 210.
- [11] FITZ-JAMES (P. C.). Dans « Mécanismes de régulation chez les micro-organismes, 1963, 124^e Symp. du C. N. R. S., édit. C. N. R. S., 1965, 529.
- [12] FOSTER (J. W.) and PERRY (J. J.). *J. Bacteriol.*, 1954, **67**, 295.
- [13] HALVORSON (H.). *The Bacteria*. I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier. édit., 1962, vol. 4, 223, Acad. Press, New York.
- [14] HIGA (A.). *Ph. D. Thesis*, 1964, MIT, Boston, U. S. A.
- [15] LEVINthal (C.), KEYNAN (A.) and HIGA (A.). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1962, **48**, 1631.
- [16] MOLDAVE (K.). *Ann. Rev. Biochem.*, 1965, **34**, 419.
- [17] MONOD (J.) and JACOB (F.). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1961, **26**, 389.
- [18] MONRO (R. E.). *Biochem. J.*, 1961, **81**, 225.
- [19] PAIGEN (K.). *Biochim. Biophys. A.*, 1963, **77**, 318.
- [20] RYTER (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1965, **108**, 40.
- [21] RYTER (A.) et SZULMAJSTER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1965, **108**, 640.
- [22] SCHAEFFER (P.), IONESCO (H.), RYTER (A.) et BALASSA (G.). Dans « Mécanismes de régulation chez les microorganismes », 1963, 124^e Symp. du C. N. R. S., édit., C. N. R. S., 1965, 553.

- [23] SPOTTS (C. R.) et SZULMAJSTER (J.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **61**, 635.
 - [24] SZULMAJSTER (J.), CANFIEL (R. E.) et BLICHARSKA (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1963, **256**, 2057.
 - [25] WARTH (A. D.), OHYE (D. F.) and MURRELL (W. G.). *J. Cell. Biol.*, 1963, **16**, 593.
 - [26] YOUNG (I. E.) and FITZ-JAMES (P. C.). *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1959, **6**, 467.
 - [27] YOUNG (I. E.) and FITZ-JAMES (P. C.). *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1959, **6**, 483.
-

RENOUVELLEMENT DES ARN ET DES PROTÉINES AU COURS DE LA SPORULATION DE *BACILLUS SUBTILIS*

par G. BALASSA

(Service de Physiologie Microbienne,
Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris)

INTRODUCTION

Des revues récentes ont traité des modifications du métabolisme intermédiaire et de l'équipement enzymatique des bactéries au cours de la sporulation [19]. Nous nous intéresserons ici au renouvellement des macromolécules (ADN, ARN et protéines) dans leur ensemble pendant cette période.

La synthèse de l'ADN s'arrête généralement en même temps que la croissance et n'est pas suivie de renouvellement : tout l'ADN de la spore a été formé pendant la croissance [15, 20]. En ce qui concerne les ARN et les protéines, on n'observe pas de *synthèse nette* après l'arrêt de la croissance, cependant un *renouvellement* important a lieu [17, 28, 38, 39] ; la situation rappelle celle décrite chez des espèces bactériennes non sporogènes en phase stationnaire [25], chez lesquelles le renouvellement est cependant moins rapide. De même, ce renouvellement est moins rapide chez certains mutants asporogènes que chez la souche sauvage [1, 35]. Les observations, faites chez diverses espèces de *Bacillus*, n'indiquent pas de différences fondamentales.

Nous nous sommes proposé d'étudier ici le renouvellement des ARN et des protéines au cours de la sporulation de *B. subtilis*, ainsi que les mécanismes de régulation qui en déterminent la vitesse. Il n'est peut-être pas inutile de rappeler que, pendant ce processus, les bactéries deviennent des organismes bicellulaires, composés d'une cellule sporangiale contenant la préspore. Le matériel, étudié dans les expériences qui suivent, étant l'ensemble de ce complexe, la signification des phénomènes observés souffre donc d'une ambiguïté difficilement évitable. La présence constante, dans une population sporulante, de bactéries qui ne sporulent pas (20-50 p. 100) augmente encore la difficulté.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

SOUCHES. Toutes les souches dérivent de la souche Marburg de *D. subtilis*. Deux mutants de cette souche : le mutant réquérant l'indole, Ind^-_{168} , et le mutant Sm HI, résistant à la streptomycine, sont utilisés comme souches sporogènes. Les mutants de sporulation, spontanés ou induits par irradiation aux rayons ultraviolets, dérivent soit du mutant Ind^-_{168} , soit, plus rarement, de la souche Marburg sauvage. Tous les mutants proviennent du laboratoire de P. Schaeffer et ont été décrits ailleurs [32, 10]. Dans chaque expérience effectuée sur des mutants, le nombre de spores formées est déterminé à t_{20} .

MÉTHODES. Le milieu utilisé, la culture de sporulation et les méthodes biochimiques ont été décrits dans des articles précédents (p. 5, 13, 60 et [6, 7, 9]). Les ARN bactériens sont préparés par la même méthode que les ARN sporaux [6], mais après un broyage plus court (une minute), et sans addition de Mg.

Les antibiotiques ont été utilisés à la concentration finale de 100 $\mu\text{g/ml}$. S'il n'est pas indiqué autrement, la valine- ^{14}C (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$) et l'uracile- ^{14}C (5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) sont ajoutés respectivement à 1,0 et 0,25 $\mu\text{Ci/ml}$. L'excès d'uracile froid est généralement de $5,10^{-3}$ M. Les 20 acides aminés sont ajoutés chacun à 25 $\mu\text{g/ml}$.

RÉSULTATS

1° VITESSE DE RENOUVELLEMENT DES ARN ET DES PROTÉINES PENDANT LA SPORULATION. — Si l'on ajoute un excès d'uracile radioactif pendant la croissance, son incorporation suit de près l'augmentation de la densité optique, et s'arrête avec la croissance (fig. 1). L'uracile incorporé n'est libéré des bactéries que lors de leur lyse ; il ne s'échange pas contre de l'uracile exogène ; si à des bactéries, marquées pendant leur croissance, on ajoute un grand excès d'uracile non radioactif (fig. 1), la radioactivité de la fraction acido-insoluble ne diminue que de moins de 20 p. 100 en cinq heures ; cette diminution qui s'observe d'ailleurs également sans addition d'uracile non marqué, est sans doute due à une faible lyse de la culture. Cependant, de l'uracile- ^{14}C , ajouté à des cultures après l'arrêt de la croissance, est incorporé dans des bactéries, ce qui montre l'existence d'un renouvellement des ARN. Pour l'étudier, nous avons ajouté de l'uracile- ^{14}C à des temps variables de la sporulation (fig. 2). Son incorporation, parfois plus lente entre t_0 et t_1 , se fait ensuite à un *taux constant tout au long de la sporulation*, même après l'apparition de spores thermorésistantes. Elle se maintient linéaire pendant au moins trois à quatre heures (fig. 3), il ne s'agit donc pas de la dégradation répétée d'une petite fraction des ARN,

mais du *renouvellement graduel d'une partie considérable des ARN de la cellule*. Si l'on ne tient pas compte des changements, au cours de la sporulation, de la composition du milieu et de la contribution relative des précurseurs endogènes et exogènes, les vitesses d'incorporation mesurées correspondent à un renouvellement continu des ARN au taux de 2 p. 100 par heure. La valine- ^{14}C (et d'autres acides aminés) s'incorpore avec une cinétique semblable (fig. 2), les vitesses de synthèse des ARN et des protéines sont à tout moment proportionnelles. Toutes les courbes d'incorpo-

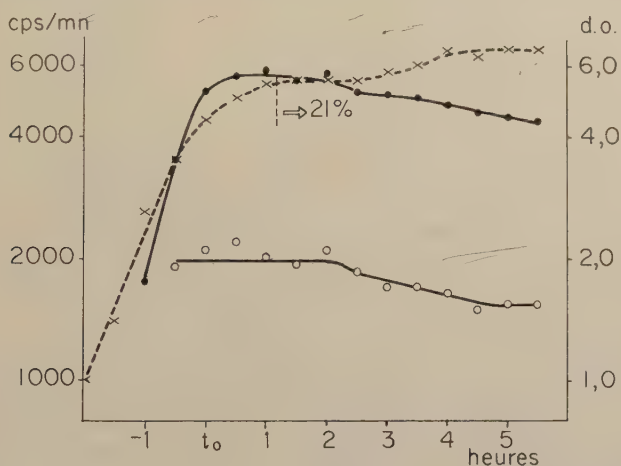


FIG. 1. — Absence de synthèse nette d'ARN au cours de la sporulation.

Une culture (—●—) est marquée continuellement par un excès d'uracile- ^{14}C ($0,25 \mu\text{Ci/ml}$, 10^{-3} M), ajouté à t_{-2} . A une culture parallèle (—○—), marquée pendant une heure en croissance exponentielle ($0,25 \mu\text{Ci/ml}$ d'uracile- ^{14}C , $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) un excès d'uracile froid (10^{-3} M) est ajouté à $t_{-0,75}$. La radioactivité incorporée est déterminée dans les deux cultures. Densité optique : --- x ---.

ration s'extrapolent au moment de l'addition des précurseurs, ces derniers pénètrent donc rapidement et ne sont pas dilués dans un pool intracellulaire important.

2° NATURE DES ARN STABLES SYNTHÉTISÉS PENDANT LA SPORULATION.

— Dans l'article précédent (p. 60 et [9]), nous avons montré que des ARN messagers instables et des ARN « stables » (en présence d'actinomycine) sont synthétisés dans des proportions constantes tout au long de la sporulation. L'analyse, par centrifugation en gradient de saccharose, des ARN stables ne met en évidence que des ARN solubles (4 S) et ribosomaux (16 S et 23 S, voir fig. 6); les proportions relatives des deux types d'ARN seront déterminées sur les

profils de sédimentation obtenus. Si l'on marque les bactéries par l'uracile- ^{14}C à partir de t_1 pendant trente minutes ou quatre heures, 24 p. 100 des ARN totaux synthétisés sont de type soluble; des valeurs voisines sont obtenues lorsque le marquage est fait à t_3 (22 p. 100) ou à t_5 [33 p. 100] (voir fig. 5). En croissance exponen-

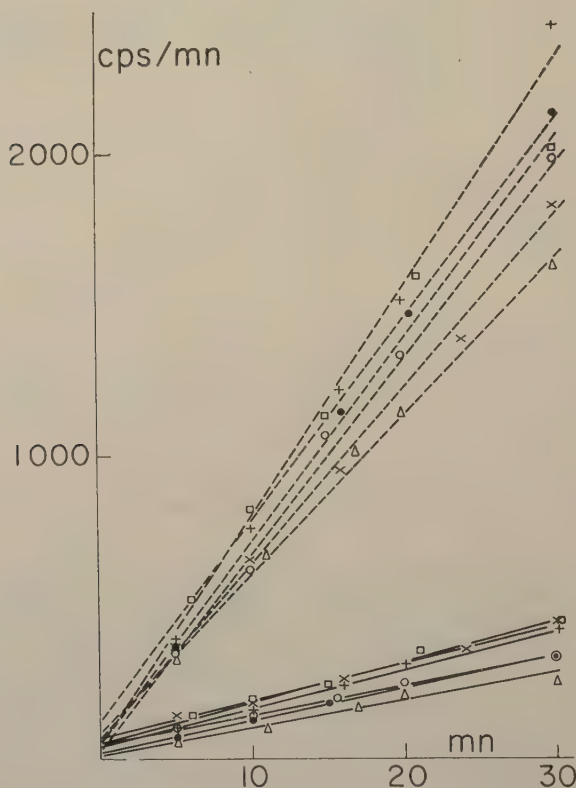


FIG. 2. — Renouvellement des ARN et des protéines.

L'incorporation de l'uracile- ^{14}C (—) et de la valine- ^{14}C (---), ajoutés à une culture Sp^+ à 0,5 (x), 1 (□), 1,5 (●), 2 (+), 2,5 (○) et 3,5 (△) heures après t_0 est mesurée.

tielle, avec un temps de génération de trente minutes, les ARN totaux contiennent 17 p. 100 d'ARN soluble ([14] et Balassa, inédit). (Si la croissance est ralentie, ce chiffre devient plus élevé.) En première approximation, les bactéries synthétisent donc, au cours de la sporulation, des ARN solubles et ribosomaux (ainsi

que des ARN messagers, [9]) dans les mêmes proportions que pendant la croissance, avec une augmentation légère en faveur des ARN solubles. Les proportions relatives des ARN ribosomaux 16 S et 23 S synthétisés pendant la croissance, ou pendant la sporulation, sont les mêmes.

La conclusion générale s'impose donc que pendant tout le cycle sporale les mêmes types d'ARN sont synthétisés dans des proportions constantes (voir aussi [7]).

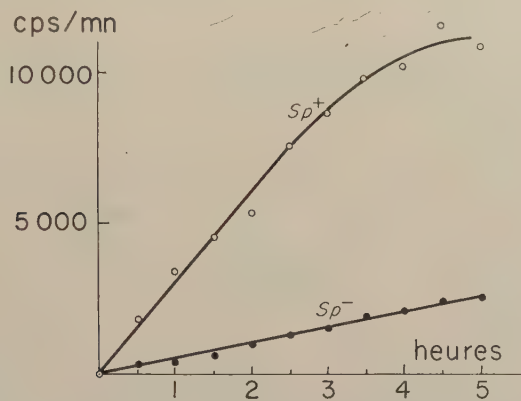


FIG. 3. — Renouvellement des ARN chez des souches *Sp*⁺ et *Sp*⁻. L'incorporation de l'uracile-¹⁴C, ajouté aux deux cultures à t_0 , est suivie pendant cinq heures.

3° STABILITÉ DES ARN EN PRÉSENCE D'ACTINOMYCINE. — Nous venons de voir qu'une fraction importante des ARN est soumise à un renouvellement non négligeable. En absence de synthèse nette, les précurseurs de l'ARN synthétisé doivent provenir de la dégradation d'ARN préexistants ; les produits de dégradation, préférentiellement utilisés à la synthèse des ARN, ne sont pas échangeables avec les précurseurs exogènes. Nous avons essayé de mettre en évidence cette dégradation en inhibant la synthèse de tous les ARN par l'actinomycine.

Si des bactéries en croissance exponentielle, uniformément marquées à l'uracile-¹⁴C, puis incubées avec un excès d'uracile pour chasser la radioactivité des fractions instables, sont ensuite traitées par l'actinomycine, il subsiste une fraction entièrement stable [24]. Par contre, si l'on fait sporuler des bactéries préalablement marquées pendant la croissance en présence d'un excès d'uracile froid, l'addition d'actinomycine est suivie de la dégradation rapide d'une partie de l'ARN, petite mais significative, la majeure partie restant

stable [ou se dégradant plus tard, une certaine lyse des bactéries n'étant pas exclue] (fig. 4, voir aussi [9]). Des résultats analogues sont obtenus si l'on marque des bactéries non plus pendant la croissance, mais pendant la sporulation. Il apparaît donc que *des ARN bactériens, stables pendant la croissance, sont dégradés à chaque moment de la sporulation*. Les ARN stables, synthétisés au début de la sporulation, subissent ultérieurement le même sort. Cette dégradation, initialement rapide, s'arrête cependant bientôt en présence d'actinomycine et laisse subsister la majorité des ARN stables. L'interprétation de ces résultats et la contradiction appa-

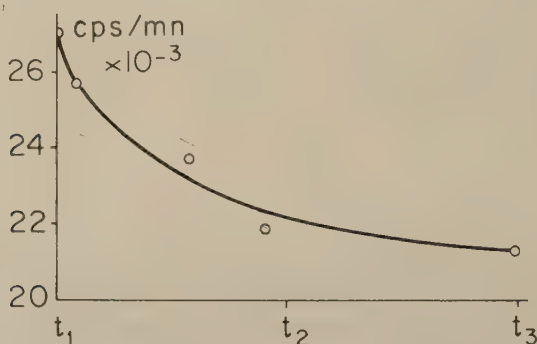


FIG. 4. — Stabilité des ARN en présence d'actinomycine.

Des bactéries, marquées à l'uracile- ^{14}C pendant trente minutes, sont ensuite incubées à partir de $t_{-0,25}$ en présence d'un excès d'uracile froid ($2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$). L'actinomycine est ajoutée à t_1 . 80 p. 100 de la radioactivité incorporée reste acido-insoluble.

rente entre l'existence d'un renouvellement continu des ARN et leur stabilité relative en présence d'actinomycine seront considérés dans la discussion.

4° DÉGRADATION DES ARN RIBOSOMAux ET ACCUMULATION DES ARN SOLUBLES. — Deux faits méritent d'être rapprochés : 1° les ARN des spores mûres contiennent deux fois plus d'ARN solubles que ceux des cellules végétatives [14, 6]; et 2° pendant la sporulation une quantité non négligeable des ARN dits stables se dégrade. Plusieurs expériences (fig. 5) ont été effectuées pour étudier la stabilité des différents types d'ARN pendant la sporulation; dans une première, des bactéries sont marquées à l'uracile- ^{14}C pendant six doublements, puis incubées en présence d'uracile non marqué. Les ARN, extraits après t_4 , contiennent 31 p. 100 d'ARN solubles, la radioactivité étant uniformément distribuée entre toutes les fractions (fig. 6a). Un enrichissement important des bactéries en

ARN solubles a donc lieu pendant les quatre premières heures de la sporulation, et cela, nous l'avons vu, en absence de synthèse ou de dégradation nettes d'ARN. Puisque, dans une culutre parallèle, les ARN marqués pendant ces quatre heures ne contiennent que 24 p. 100 d'ARN soluble (fig. 6 b), l'enrichissement ne peut être attribué à une synthèse plus rapide de ceux-ci, il suggère plutôt une dégradation préférentielle des ARN ribosomiaux. Deux autres expériences, plus détaillées (résumées fig. 5), confirment cette

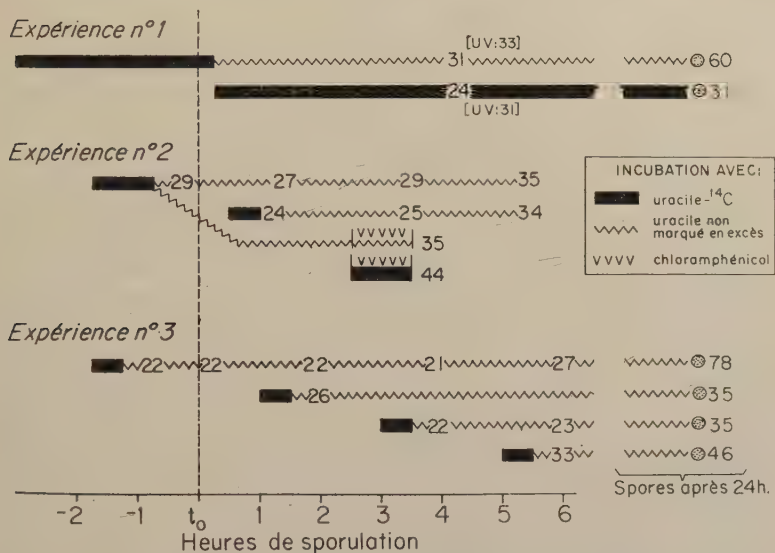


FIG. 5. — Evolution de la teneur en ARN solubles.

Les bactéries sont marquées à l'uracile-¹⁴C et ensuite incubées en présence d'uracile froid. Les chiffres représentent la radioactivité incorporée dans les ARN solubles, en pour cent par rapport aux ARN totaux, extraits des bactéries aux temps indiqués et des spores après vingt-quatre heures d'incubation. Dans la première expérience les chiffres entre parenthèses indiquent la teneur des ARN totaux en ARN solubles, mesurée dans les mêmes préparations par leur absorption à 260 m μ .

conclusion : dans toutes les cultures on peut observer, au cours de la sporulation, une augmentation de la teneur en ARN solubles d'au moins 20 p. 100. Le fait que les ARN synthétisés pendant la sporulation contiennent généralement une proportion plus faible d'ARN soluble que les ARN marqués pendant la croissance et extraits pendant la sporulation (à une exception près : t₅ de l'expérience 3), prouve que le transfert de matériel radioactif des ARN ribosomiaux aux ARN solubles, que l'on observe pendant la sporu-

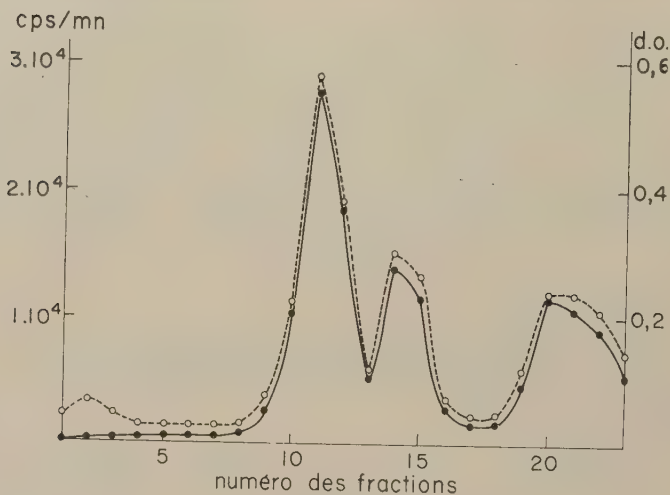


FIG. 6 a.

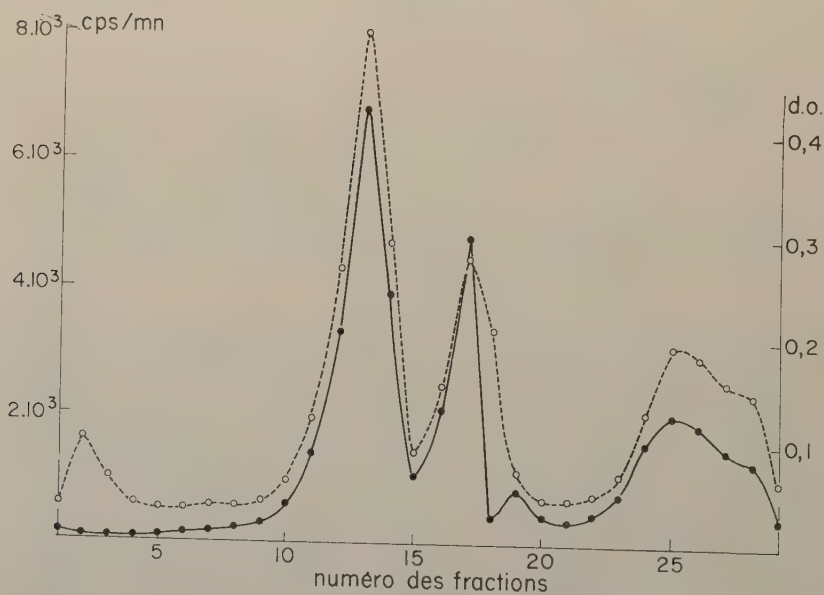


FIG. 6 b.

FIG. 6. — Profil de sédimentation des ARN extraits pendant la sporulation.
 a) Les bactéries sont marquées à l'uracile- ^{14}C ($0,07 \mu\text{Ci/ml}$) pendant la durée de six temps de génération en croissance exponentielle et incubées à partir de $t_{0,15}$ en présence d'un excès d'uracile froid ($2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$). b) Les bactéries sont marquées à partir de $t_{0,25}$. L'ARN est extrait des deux cultures à $t_{4,25}$ et centrifugé. ---○--- densité optique à $260 \text{ m}\mu$; —●— radioactivité. Teneur en ARN solubles : voir fig. 5, expérience 1.

lation, n'est pas dû à une synthèse préférentielle des ARN solubles au cours du renouvellement des ARN ; seule la *dégradation préférentielle des ARN ribosomaux* peut donc expliquer les résultats obtenus.

L'examen détaillé des valeurs obtenues exige cependant quelques considérations supplémentaires : 1° la teneur des bactéries en ARN solubles avant t_0 varie d'une expérience à l'autre ; ces variations sont liées aux variations de la vitesse de croissance : la croissance des bactéries a été particulièrement lente dans l'expérience 2 ; 2° dans les deux premières expériences, la proportion des ARN solubles augmente jusqu'à 30-35 p. 100, et atteint ainsi celle des ARN de la spore mûre ; l'augmentation plus faible, observée dans l'expérience 3, résulte de la sporulation plus faible de cette culture ; 3° les valeurs observées suggèrent que l'enrichissement en ARN solubles se passe principalement vers la fin de la sporulation (t_4 - t_6) ; les expériences ne sont cependant pas suffisamment précises pour affirmer cette conclusion (contredite d'ailleurs par l'analyse de l'origine des ARN de la spore, voir plus loin) ; 4° une partie de la radioactivité incorporée entre t_0 et t_1 (expérience 2) est transférée des ARN ribosomaux aux ARN solubles ; les ARN ribosomaux synthétisés pendant la sporulation subissent donc la même dégradation que ceux déjà présents dans la bactérie. Cette dernière remarque suggère que les valeurs obtenues après trente minutes de marquage pendant la sporulation surestiment la synthèse des ARN solubles, à cause de la dégradation rapide d'une partie des ARN ribosomaux néoformés. Ces derniers pourraient être particulièrement instables vers la fin de la sporulation quand, après trente minutes de marquage, 33 p. 100 de la radioactivité se trouvent dans la partie soluble (expérience 3).

En conclusion, au cours de la sporulation des ARN ribosomaux et solubles sont synthétisés dans les mêmes proportions (ou des proportions peu différentes) que pendant la croissance, mais la dégradation préférentielle des premiers enrichit les bactéries en ARN solubles. Si l'on admet que la teneur en ARN solubles passe en moyenne de 20 à 30 p. 100 en cinq heures, cette augmentation de 50 p. 100 permet d'estimer la vitesse de renouvellement des ARN à 10 p. 100 par heure, estimation minimum qui ne tient compte ni de la dégradation des ARN ribosomaux formés pendant la sporulation, ni de la présence des bactéries qui ne sporulent pas. (Si l'on supposait que les ARN solubles étaient également dégradés, mais plus lentement que les ARN ribosomaux, l'estimation de la vitesse de renouvellement serait considérablement augmentée).

5° ORIGINE DES ARN SPORAUX. — Les expériences précédentes portent, nous l'avons déjà souligné, sur l'ensemble du complexe

bicellulaire préspore-sporange ; elles n'indiquent pas si les changements décrits sont directement impliqués dans la formation (ou la conservation) des ARN qui vont être inclus dans la spore. Cette dernière contient [14, 6] des ARN ribosomaux et solubles (65 p. 100 et 35 p. 100 respectivement) ; le rapport ARN/ADN

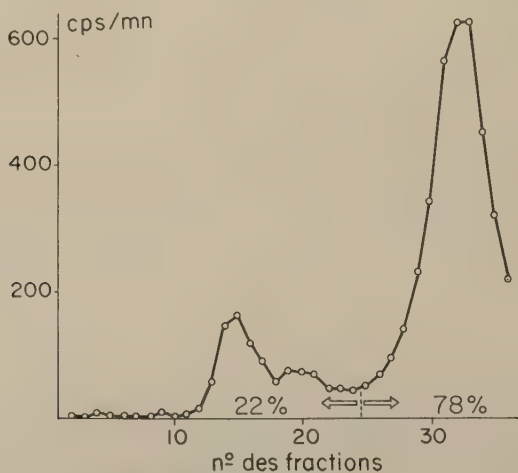


FIG. 7 a.

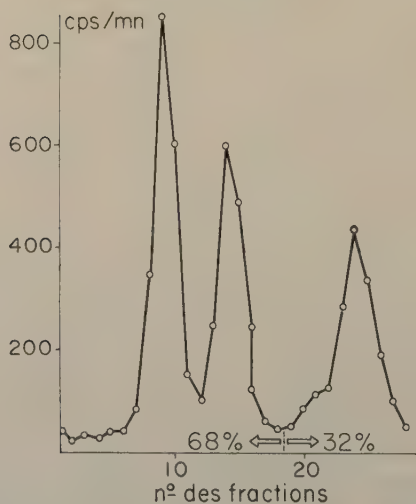


FIG. 7 b

FIG. 7. — Profil de sédimentation des ARN sporaux.

Les bactéries sont marquées à l'uracile- ^{14}C pendant trente minutes, à partir de a) $t_{-1,5}$ et b) $t_{3,5}$. Elles sont ensuite incubées en présence d'uracile froid ($5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) jusqu'à la formation des spores. Les ARN sont isolés de celles-ci
Voir fig. 5, expérience 3.

y est par ailleurs plus faible que dans des bactéries en croissance rapide [45, 7]. Pour déterminer à quel moment de la croissance ou de la sporulation les différents types d'ARN sporaux sont synthétisés, des bactéries, marquées dans les expériences déjà décrites (fig. 5), ont été incubées jusqu'à la formation des spores. Après purification de celles-ci, les ARN ont été extraits et analysés selon les méthodes déjà décrites [6]. La figure 7 montre les profils de sédimentation des ARN des spores, obtenues des bactéries marquées soit pendant leur croissance exponentielle, soit vers t_2 . Dans le premier cas, la majorité de la radioactivité se trouve dans la fraction soluble, dans le second, la distribution de la radioactivité correspond à la composition des ARN sporaux ; ce dernier résultat s'obtient d'ailleurs aussi lorsqu'on marque des bactéries à t_1 . L'expérience suggère donc que parmi les ARN de la bactérie végétative, les ARN solubles sont conservés et incorporés directement dans la spore, tandis que les ARN ribosomiaux sont en majorité dégradés. Tout au long de la sporulation, des ARN ribosomiaux et solubles sont synthétisés ; une partie de ces ARN sera finalement incorporée dans la spore. La proportion plus élevée de radioactivité dans les ARN solubles après marquage en fin de croissance ou vers la fin de la sporulation pourrait être attribuée à l'instabilité particulièrement prononcée des ARN ribosomiaux formés à ce moment. De toute façon, l'interprétation des résultats soulève d'autres problèmes qui seront considérés dans la discussion.

6° ETUDE DES MUTANTS DE SPORULATION. — Le renouvellement des ARN des bactéries pendant la phase stationnaire n'est pas restreint aux bactéries sporogènes ; il s'observe également chez *E. coli* par exemple, bien qu'à un taux plus faible [25]. Seule la comparaison d'une souche sporogène et de ses mutants de sporulation peut indiquer dans quelle mesure le renouvellement, observé dans les conditions de sporulation, est lié à ce processus même. Avant de les étudier, nous décrirons brièvement les caractéristiques de quelques mutants de sporulation, leur classification, ainsi que leur comportement pendant et après la croissance.

Un grand nombre de mutants de sporulation ont été isolés et classés selon le stade de la sporulation qu'ils peuvent atteindre [32]. Chez certains d'entre eux, aucun signe de sporulation ne peut être décelé au microscope électronique : ils sont bloqués au stade zéro. Les autres peuvent atteindre des stades divers de la sporulation : on distingue des mutants de stade I, II, ..., V. La recherche d'un antibiotique, dont la production fait partie des événements précoces de la sporulation [3], permet de compléter cette classification. En effet, tous les mutants, bloqués au stade I, ou à un stade plus tardif, produisent cet antibiotique, tandis que les mutants de stade zéro se divisent en deux groupes : producteurs et non

producteurs d'antibiotique (Ab^+ et Ab^-), le bloc génétique étant apparemment plus précoce chez les mutants non producteurs. Ces derniers seront appelés, pour simplifier l'exposé, *mutants précoces*, tous les autres étant qualifiés de *tardifs*. Un critère, indépendant de la classification précédente, permet également de diviser les mutants de sporulation en deux groupes ; les *mutants asporogènes* (Sp^-) qui ne forment aucune spore dans les conditions étudiées, et les *mutants oligosporogènes* (Osp [32]) qui sporulent à une fréquence basse génétiquement déterminée. Chez ces derniers, la majorité de la population, n'atteignant pas la thermorésistance, peut être bloquée aussi à l'un quelconque des stades de la sporulation. La liste des mutants étudiés ici et quelques-unes de leurs propriétés sont présentées dans le tableau I.

TABLEAU I. — Propriétés des mutants de sporulation.

MUTANT (1)	STADE MORPHOLOGIQUE DU BLOCAGE (1)	PRODUCTION D'ANTIBIOTIQUE (1)	RENOUVELLEMENT (To) ²
Sp +		+	+
Sp - 1	— o ou I	—	—
Sp - 3	o	—	—
Sp - 5	o	—	—
Osp 75	o	—	+
Osp A	o	+	+
Osp N4	o	±	—
Osp N1	o	+	+
Osp C	I	+	+
Osp II	II	+	+
Sp - 12 UV	II	+	+
Sp - 68	III	+	+
Osp 4 UV	III	+	+
Sp - 94	III	+	+
Osp B	IV	+	+

D'après [5].
 1 Voir Schaeffer et al. [32].
 2 Voir texte.

Pendant la croissance, aucune différence n'est observée entre la souche sporogène et les mutants. Les mesures de densité optique montrent que la croissance se fait à la même vitesse et atteint le même maximum chez toutes les souches étudiées ; les taux d'incorporation de l'uracile-¹⁴C et de la valine-¹⁴C sont également les mêmes. Après l'arrêt de la croissance, la sporulation de la souche

sauvage se traduit par une augmentation supplémentaire de la densité optique, due à la formation des spores réfringentes; pendant cette période, la densité optique des mutants reste sensiblement constante, mais une lyse importante n'est observée chez aucun d'eux. Quant au développement des prés spores, il semble suivre la même cinétique, chez des mutants bloqués à des stades divers, jus-

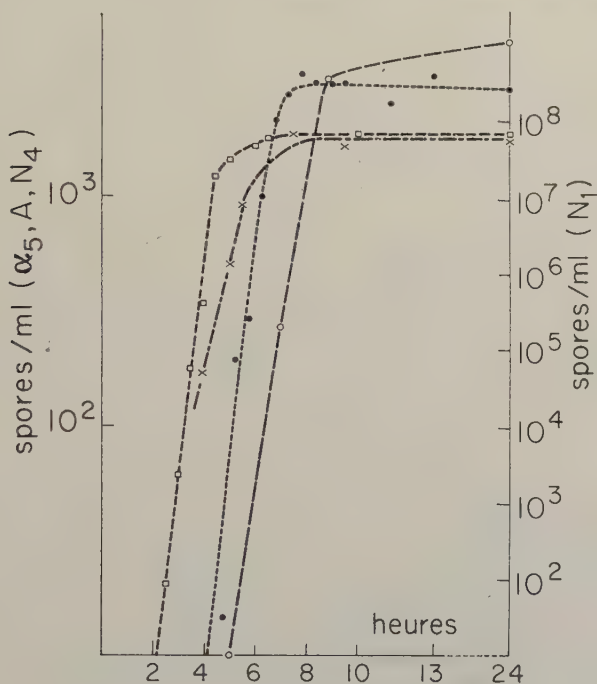


FIG. 8. — Apparition de la résistance au chloroforme chez des mutants oligosporogènes.

Les numérations sont faites sur des échantillons traités au chloroforme.
Mutants Osp : N_1 (□), α_5 (●), A (○) et N_4 (×).

qu'au blocage de la sporulation que chez la souche sauvage (Ryter, résultats inédits). Enfin, la cinétique de formation de spores résistantes a été suivie chez plusieurs mutants oligosporogènes (fig. 8). Cette cinétique est, *grosso modo*, identique chez les souches étudiées (les faibles variations observées peuvent être attribuées à l'imprécision avec laquelle t_0 est déterminé ou à des variations incontrôlées des conditions de culture).

7° RENOUVELLEMENT DES ARN CHEZ UN MUTANT PRÉCOCE. — S'il est vrai qu'un mutant précoce n'a amorcé aucune réaction spécifique de la sporulation, son comportement après l'arrêt de la croissance indique ce que serait le comportement de la souche sporogène en phase stationnaire si celle-ci ne sporulait pas. Le mutant précoce, Sp^- (de stade zéro, Ab^-) a été choisi pour ces expériences. Comme l'a montré la figure 3, un renouvellement continu des ARN s'observe également chez ce mutant, mais à un taux plus faible que chez les souches Sp^+ . Les ARN accumulés par ce mutant contiennent des ARN ribosomaux et solubles, dans les mêmes proportions que dans la souche sauvage. La seule différence observée jusqu'ici porte sur la vitesse de synthèse de ces ARN. Cette vitesse est, à partir de t_1 , de deux à cinq fois plus élevée chez la souche Sp^+ . La différence réelle est encore plus importante, puisqu'on n'obtient généralement que 50 à 80 p. 100 de sporulation, et les bactéries qui ne sporulent pas se comportent apparemment comme le mutant asporogène (voir plus loin). Peut-être aussi le noyau sporal a-t-il une activité supérieure à celle du noyau sporangial; il est donc possible que la vitesse de synthèse des ARN soit jusqu'à dix fois plus grande dans la préspore que dans des bactéries asporogènes. Une différence de même ordre de grandeur est d'ailleurs également observée en ce qui concerne la synthèse des protéines, toujours proportionnelle à celle des ARN.

Dans certaines expériences, la vitesse de synthèse chez la souche Sp^+ passe par un minimum entre t_0 et t_1 : cette période est celle où se décide l'engagement des bactéries dans la sporulation. Il semble donc qu'avant cette décision, les bactéries Sp^+ se comportent comme les mutants précoces. L'observation suivante le confirme: dans certains lots de milieu complexe, où les bactéries Sp^+ , pour une raison inconnue, sporulent très mal (à moins de 5 p. 100), la vitesse de renouvellement des ARN est la même chez les souches Sp^+ et Sp^- , même plusieurs heures après l'arrêt de la croissance.

8° EFFET DU CHLORAMPHÉNICOL ET DES ACIDES AMINÉS SUR LA SYNTHÈSE DES ARN. — La vitesse de renouvellement des ARN étant différente chez la souche sauvage et chez le mutant Sp^- , il a paru nécessaire de rechercher les facteurs qui déterminent cette vitesse, et, d'une façon générale, d'étudier la régulation de la synthèse des ARN pendant la sporulation. Celle-ci commence après l'épuisement du milieu, dans des conditions qui présentent des analogies avec celles d'un transfert des bactéries dans un milieu pauvre (« *shift-down* »). Dans ce dernier cas, la synthèse des ARN se ralentit, immédiatement après le transfert des bactéries, à moins de 10 p. 100 de sa vitesse antérieure; cependant l'addition de chloramphénicol peut la rétablir sans tarder, cet effet étant géné-

ralement attribué à l'accumulation intracellulaire d'acides aminés, régulateurs de la synthèse des ARN (revue par Neidhardt [29]). L'effet du chloramphénicol sur la synthèse d'ARN a donc été étudié, après épuisement du milieu, chez la souche sauvage ainsi que chez le mutant asporogène Sp_3^- .

Pendant la croissance exponentielle en milieu complexe, le chloramphénicol n'a pas d'effet immédiat sur la synthèse des ARN. Au cours de la sporulation de la souche sauvage, par contre, il

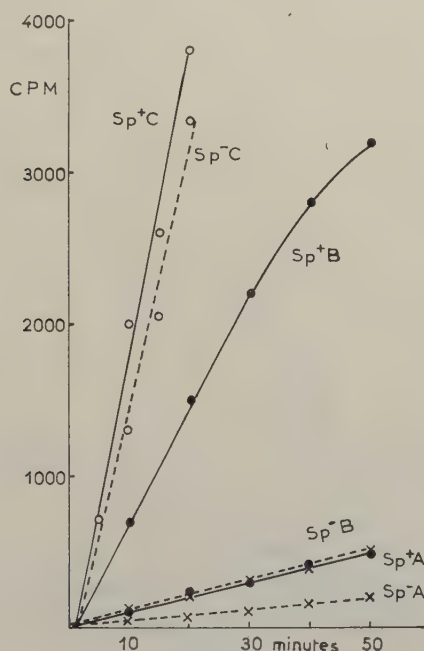


FIG. 9. — Effet du chloramphénicol sur la synthèse des ARN.

L'uracile- ^{14}C est ajouté à t_3 aux souches Sp^+ (—) et Sp_3^- (---), A, seul (x), B avec du chloramphénicol (●) et C avec du chloramphénicol et un mélange des 20 acides aminés (○). D'après [4].

stimule la vitesse d'incorporation de l'uracile- ^{14}C par un facteur d'environ dix (fig. 9) ; cette stimulation est immédiate (le temps de latence, s'il existe, ne dépasse pas 1 min.). Chez le mutant Sp_3^- , par contre, cette stimulation est très faible. L'inégalité dans la vitesse de renouvellement des ARN qui existe entre les deux souches s'accroît donc en présence de chloramphénicol, soit parce que celui-ci n'entraîne pas l'accumulation des acides aminés chez les

deux souches, soit parce qu'un autre facteur que les acides aminés limite la synthèse des ARN dans le mutant asporogène.

Si, en même temps que le chloramphénicol, on ajoute un mélange des 20 acides aminés, la synthèse des ARN se fait encore plus rapidement chez la souche sauvage qu'en l'absence des acides aminés; mais cette fois-ci le mutant asporogène répond à cette double addi-

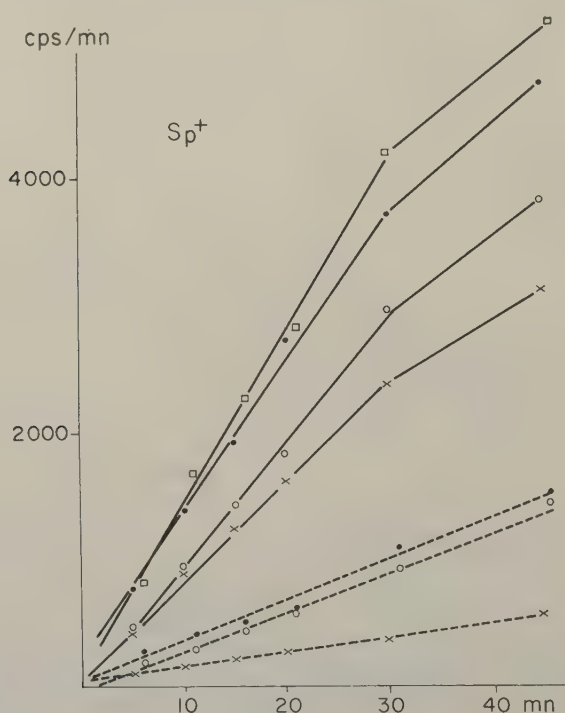


FIG. 10 a.

FIG. 10. — Stimulation de la synthèse des ARN.

De l'uracile- ^{14}C est ajouté : a) à la souche sauvage à t_3 , et b) au mutant Sp_3^- à t_1 , avec (—) ou sans (- - -) chloramphénicol, sans addition supplémentaire (x), avec un mélange des acides aminés (●), avec du glucose (0,5 p. 100, ○) et enfin avec le mélange des acides aminés plus glucose (□).

tion aussi bien que la souche sauvage; le taux de synthèse s'approche, chez les deux souches, de celui qu'on observe chez des bactéries en croissance exponentielle. Les deux souches ont donc la même capacité de synthétiser des ARN, et cette synthèse est, chez les deux souches, limitée par l'absence des acides aminés. Ce qui différencie le mutant de la souche sauvage semble donc être

son *incapacité d'accumuler des acides aminés* en présence de chloramphénicol. Un certain nombre d'observations, concernant la stimulation de la synthèse d'ARN, seront décrites ici et discutées plus loin :

a) Une stimulation plus ou moins marquée de la synthèse des ARN peut être obtenue dans des conditions variées (fig. 10). Le mélange des acides aminés a un effet, même en absence de chloramphénicol, sur les deux souches, mais cet effet est beaucoup plus

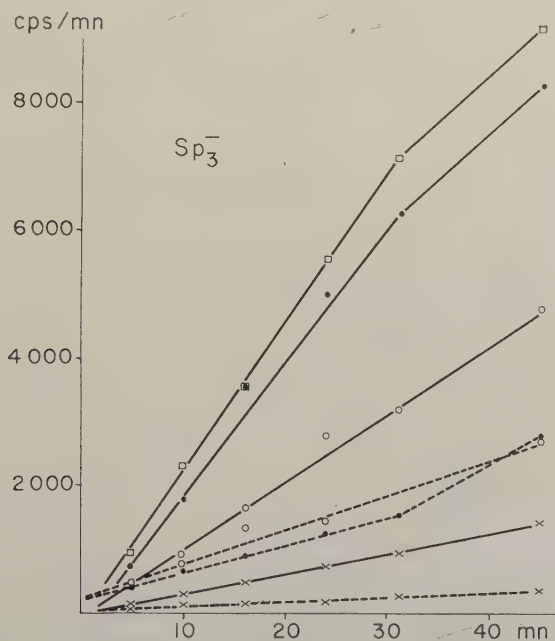


FIG. 10 b.

faible qu'il n'est en sa présence ; il en est de même avec le glucose ou le glycérol. En présence du chloramphénicol, une synthèse considérable a lieu si l'on ajoute soit des acides aminés, soit du glucose ; leur addition simultanée augmente encore la vitesse de cette synthèse. Enfin, chez le mutant asporogène, et en présence de chloramphénicol, les nucléosides n'ont aucun effet significatif, tandis que l'addition de groupes de 4 acides aminés permet des stimulations intermédiaires, variables selon les acides aminés utilisés.

b) Pour savoir si la mutation concernant la sporulation d'une part, les changements dans le renouvellement des ARN d'autre part, ne sont pas dus à une coïncidence, l'étude génétique de ces

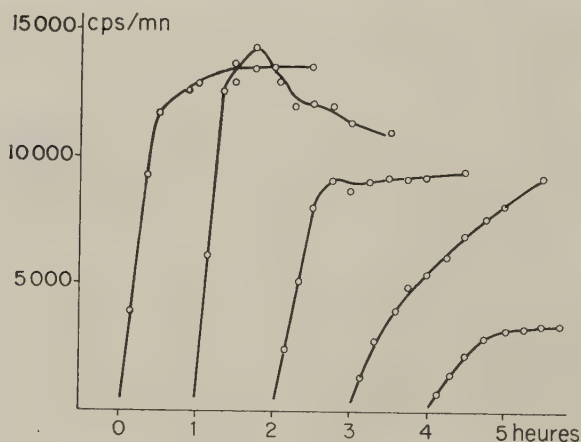


FIG. 11 a.

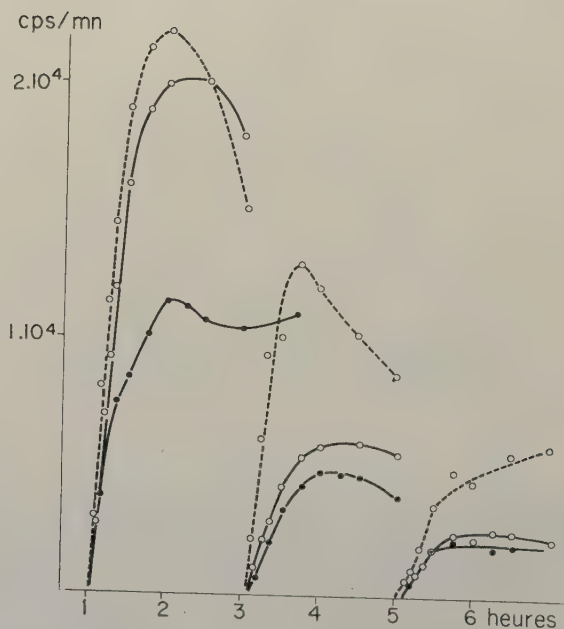


FIG. 10 b.

FIG. 11. — Effet du chloramphénicol sur la synthèse des ARN. L'incorporation d'uracile-¹⁴C en présence de chloramphénicol est mesurée à des temps variés de la sporulation, a) chez la souche Sp⁺, b) chez le mutant précoce Sp₇ en présence d'un mélange d'acides aminés (---○---) et chez le mutant tardif Osp₁₁ avec (—○—) ou sans (—●—) acides aminés.

propriétés s'impose. Nous nous sommes contentés d'examiner un seul clone sporogène, $Sp^+ t_3$, provenant de la souche Sp_3^- , transformée par l'ADN d'une souche Sp^+ et sélectionné pour le caractère Sp^+ . Étudié dans les conditions de la figure 9, ce clone se comporte exactement comme la souche sauvage.

c) La synthèse des ARN en présence de chloramphénicol a trois caractéristiques : sa vitesse initiale, la quantité d'ARN formée à cette vitesse (estimée d'après le « niveau de cassure » des courbes

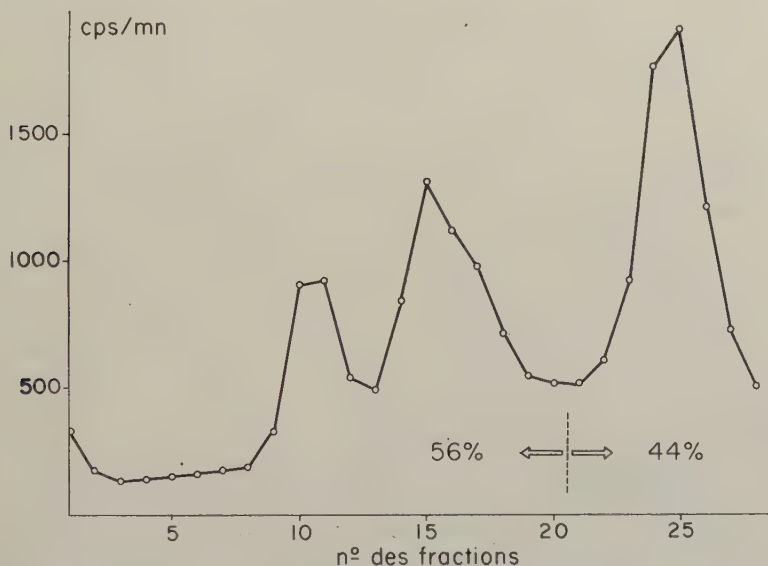


FIG. 12. — Profil de sédimentation des ARN synthétisés en présence de chloramphénicol.

Les bactéries sont marquées à l'uracile- ^{14}C en présence de chloramphénicol entre $t_{2.5}$ et $t_{3.5}$ (fig. 5, expérience 2).

d'incorporation) et la vitesse de synthèse résiduelle, après cette cassure (discussion dans [8]).

Lorsque l'incorporation de l'uracile- ^{14}C est mesurée, chez la souche sauvage en présence de chloramphénicol, pendant une durée suffisante (fig. 11 a), on arrive aux conclusions suivantes : 1° la vitesse de synthèse initiale diminue continuellement au cours de la sporulation ; 2° il en est de même des « niveaux de cassure » ; 3° les taux de synthèse résiduelle subissent des variations complexes. La même expérience, effectuée avec deux mutants de sporulation (fig. 11 b) a donné des résultats similaires ; l'addition des acides aminés augmente parfois considérablement le « niveau de cassure ».

d) Enfin, remarquons qu'une « surproduction » d'ARN, suivie d'une dégradation partielle, est souvent observée chez toutes les souches, au début de la sporulation, surtout après addition simultanée de chloramphénicol et d'acides aminés. Cette dégradation n'est pas due à la lyse des cellules (on ne l'observe pas dans des cultures parallèles contenant seulement du chloramphénicol); elle est peut-être en relation avec l'instabilité des « particules chloramphénicol » [30].

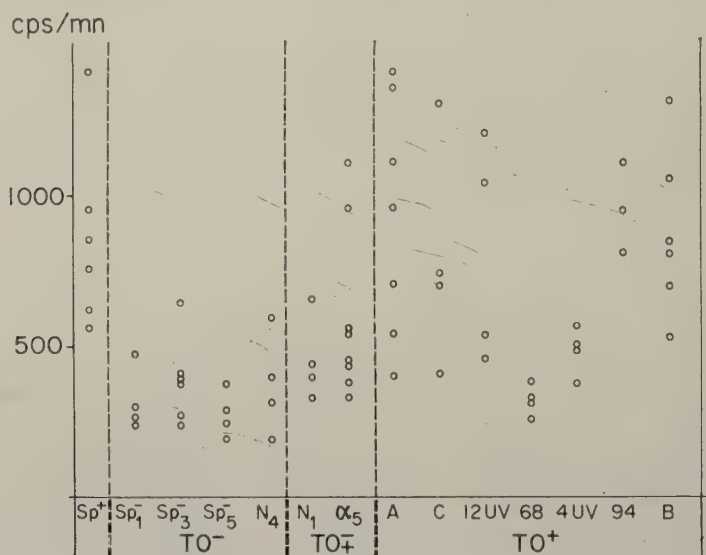


FIG. 13. — Taux de synthèse des ARN au cours de la sporulation chez divers mutants.

La vitesse d'incorporation d'uracile- ^{14}C (cps/min. incorporés par heure) a été mesurée à des temps variés de la sporulation, dans des expériences répétées (telles que fig. 2, 3 et 14).

e) Les expériences précédentes concernent l'ensemble des ARN synthétisés. Chez les bactéries en croissance, les ARN accumulés en présence de chloramphénicol sont de type ribosomal et soluble, les derniers dans des proportions d'ailleurs plus élevées [22]. Il en est de même pendant la sporulation: lorsque l'on a marqué des bactéries, en présence de chloramphénicol, de t_0 à t_3 , l'uracile- ^{14}C incorporé se trouve dans les pics ribosomaux (56 p. 100) et solubles [44 p. 100] (fig. 12). Puisque le chloramphénicol augmente la vitesse de renouvellement des ARN, et que ce renouvellement est accompagné d'un enrichissement des bactéries en ARN solubles, on s'attendrait à ce que cet enrichissement se fasse plus rapidement

en présence de l'antibiotique. Cela est en effet le cas chez des bactéries marquées pendant la croissance, un traitement par le chloramphénicol entre t_2 et t_3 augmente la radioactivité dans la fraction soluble de 27 à 35 p. 100 (fig. 4, expérience 2). Cette fois cependant, l'augmentation peut être aussi bien attribuée à la dégradation préférentielle des ARN ribosomaux préexistants qu'à la synthèse préférentielle des ARN solubles.

9° CLASSIFICATION DES MUTANTS SELON LE RENOUVELLEMENT DES ARN.

— L'existence ou l'absence d'une stimulation de la synthèse des ARN au cours de la sporulation par le chloramphénicol permet de différencier les mutants de sporulation. Pour mieux connaître la nature de la liaison entre cette propriété et la sporulation, la stimulation par le chloramphénicol a été recherché chez plusieurs mutants, déjà caractérisés par d'autres critères et appartenant à diverses classes. La liste des mutants et leurs propriétés figurent au tableau I. Dans chaque expérience la vitesse d'incorporation de l'uracile- ^{14}C a été mesurée en absence de chloramphénicol d'une part, en présence de chloramphénicol, seul ou accompagné d'un mélange des 20 acides aminés d'autre part, au début et vers la fin de la sporulation (p. ex. à t_2 et t_3) ; l'expérience a été répétée avec chaque mutant au moins deux fois. Quelques-uns des résultats sont portés figure 13.

Les taux de synthèse des ARN, en absence de chloramphénicol, mesurés dans ces différentes expériences, sont présentés figure 13. Dans une même expérience, on observe toujours que *les mutants précoces ont un renouvellement plus lent que les mutants tardifs* ; cependant ce critère est difficilement applicable à la classification systématique des mutants, car les résultats sont sujets à des variations importantes d'une expérience à l'autre. La stimulation par le chloramphénicol, en absence des acides aminés, permet par contre une classification claire (fig. 14), les mutants se groupent ainsi en deux classes : nous les appellerons, pour simplifier l'exposé, mutants à *renouvellement lent* (« turn-over » négatif, TO^-) et mutants à *renouvellement rapide* (TO^+ [5]). Le tableau I montre que chaque classe contient des mutants asporogènes et oligosporogènes, mais on voit que *les mutants TO^- sont tous bloqués au stade zéro de la sporulation*. De plus, une corrélation parfaite se manifeste, parmi les mutants étudiés, entre le renouvellement rapide des ARN (TO^+) et la production de l'antibiotique (Ab^+). Le renouvellement rapide dépend donc d'un *événement précoce* de la sporulation, événement qui, comme la production de l'antibiotique [10], a lieu chez tous les mutants tardifs, mais non chez les mutants précoces. Cette conclusion est confirmée par les observations cinétiques : les mutants TO^+ , bloqués au stade I ou II de la sporulation, c'est-à-dire avant t_2 , continuent, même à t_3 , à se comporter comme

la souche Sp^+ ; la vitesse de renouvellement ne dépend donc pas du processus de sporulation dans son ensemble, mais d'un événement précoce ayant lieu avant le stade I.

Les mutants *oligosporogènes précoces* o_3 et N_1 méritent cependant une mention spéciale: ils apparaissent en effet, dans toutes les expériences, TO^- au début de la phase stationnaire, mais au

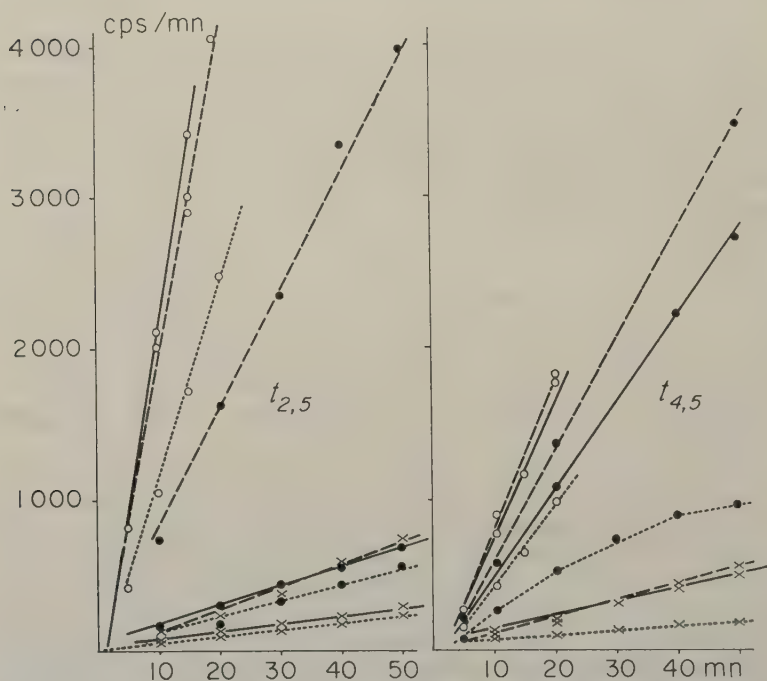


FIG. 14. — Stimulation de la synthèse des ARN chez des mutants de sporulation.

L'uracile- ^{14}C est ajouté aux temps indiqués, seul ($\times$), avec du chloramphénicol ($\bullet$) ou avec du chloramphénicol et un mélange des 20 acides aminés ($\circ$). L'expérience est la même que sur la figure 9. Mutants: Osp_A (To^+ , — — —), Sp_- (To^- , - - - - -) et Osp_{a5} (To^+ , — — —).

bout de deux ou trois heures ils deviennent TO^+ . (Provisoirement, ces mutants sont désignés TO^+ ; leur cinétique de sporulation est identique à celle d'autres mutants oligosporogènes (fig. 8), ils sont d'autre part de faibles producteurs d'antibiotique). Le comportement de ces mutants semble ajouter un argument supplémentaire à l'hypothèse selon laquelle certains mutants oligosporogènes sont des mutants de régulation [32].

DISCUSSION

Le mécanisme général de la sporulation dépasse le cadre de ce travail ; quelques problèmes, directement liés à la synthèse des ARN pendant la sporulation, seront seuls discutés ici.

1° MÉTABOLISME DES ARN. — Tout au long de la sporulation, un renouvellement important des ARN a lieu avec les caractéristiques suivantes (fig. 15) : des ARN ribosomiaux, stables pendant la croissance, sont lentement dégradés et fournissent des précurseurs.

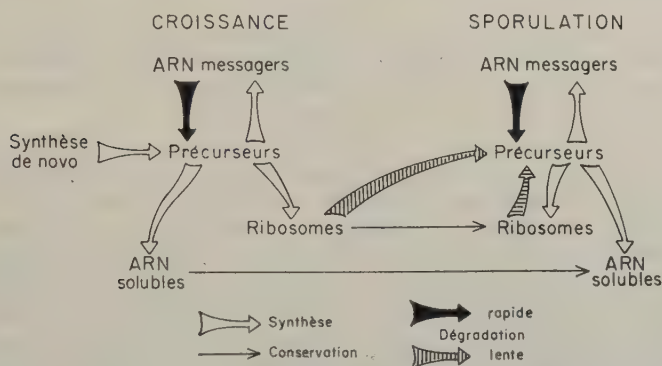


FIG. 15. — Métabolisme des ARN au cours de la sporulation.

qui sont, à leur tour, réutilisés pour la synthèse d'ARN messagers à vie courte [9], d'ARN solubles stables, et d'ARN ribosomiaux, ces derniers subissant le même sort que les ARN ribosomiaux préexistants. Les vitesses de synthèses des ARN « stables » (ribosomiaux et solubles) et des ARN instables (présumés ARN messagers) restent en proportion constante tout au long du cycle sporal [7, 9] ; par contre les proportions relatives des ARN ribosomiaux et solubles subissent, pendant la sporulation, des changements importants aboutissant à un doublement des ARN solubles. Celui-ci n'est pas dû à leur synthèse préférentielle, mais à la dégradation préférentielle des ARN ribosomiaux (voir aussi [16]). Cette dégradation pouvait se faire à vitesse constante ou être plus rapide vers la fin de la sporulation, la première hypothèse cadrant cependant mieux avec la vitesse constante de la synthèse des ARN et des protéines pendant la sporulation. Au moment de l'apparition des spores thermorésistantes, la proportion des ARN solubles dans les bactéries

atteint (ou approche de près) celle qu'on trouve dans les spores ; la composition des ARN sporaux reflète donc celle des bactéries sporulantes, et il n'est pas indispensable d'invoquer une inclusion sélective de certains types d'ARN dans la spore.

Chez des bactéries en croissance exponentielle la proportion des ARN solubles augmente avec le temps de génération [21] ; ce résultat a été confirmé chez *B. subtilis* par Doi et Igarashi [14]. Une analogie se présente donc entre les bactéries en croissance exponentielle lente, les bactéries en sporulation, les spores et les spores en germination. Cependant, au cours du cycle sporal, l'augmentation de la teneur en ARN solubles n'est pas due à une synthèse plus rapide de ces ARN, mais à leur plus grande stabilité. (Il n'est cependant pas exclu que le même mécanisme opère chez des bactéries en croissance exponentielle lente, puisque la stabilité des ribosomes en croissance exponentielle n'a été démontrée, à notre connaissance, qu'à des temps de génération relativement courts [27]. La dégradation préférentielle des ARN ribosomaux a été également décrite chez *E. coli* en phase stationnaire [26].)

2° VITESSE DE RENOUVELLEMENT DES ARN. — Pour des raisons théoriques, discutées par Mandelstam [25], il est très difficile de déterminer exactement la vitesse de renouvellement des macromolécules. Pendant la sporulation, plusieurs méthodes indépendantes permettent d'estimer la vitesse de renouvellement des ARN : 1° La vitesse d'incorporation de l'uracile-¹⁴C indique un renouvellement d'environ 2 p. 100 par heure ; cette valeur est cependant certainement inférieure à la réalité puisque les produits de dégradation des ARN ne sont pas librement échangeables avec des métabolites exogènes. 2° L'incubation en présence d'un excès d'uracile ou d'actinomycine de bactéries, préalablement marquées, ne permet pas de mettre en évidence un renouvellement plus important. 3° Par contre, la vitesse de transfert de radioactivité de la fraction ribosomale à la fraction soluble indique un renouvellement de l'ordre de 10 p. 100 par heure. Cette valeur est encore une valeur minimale, puisqu'elle ne tient pas compte des bactéries qui ne sporulent pas. 4° Enfin, chez les bactéries sporulantes, la proportion des ARN solubles passe en cinq heures de 17 p. 100 dans la bactérie en croissance rapide, à 35 p. 100 dans la spore. Ce doublement permet d'estimer, en première approximation, le *renouvellement réel* à 20 p. 100 des ARN totaux par heure. En conclusion : 1° les bactéries sont le siège, tout au long de la sporulation, d'un renouvellement très important des ARN, comportant la dégradation des ARN ribosomaux à la vitesse de 20 p. 100 par heure ; 2° l'uracile exogène n'entre que très peu en compétition avec les produits de dégradation des ARN ribosomaux. La vitesse de renouvellement, mesurée au cours de la sporulation, dépasse considérable-

ment les valeurs obtenues chez des mutants asporogènes, chez *Escherichia coli* [25] ou chez *Bacillus cereus* en phase stationnaire [36]; la sporulation entraîne donc un renouvellement particulièrement rapide des constituants cellulaires. Un renouvellement très rapide des protéines a été décrit par Aubert et Millet [4].

Dans les calculs précédents, nous avons admis arbitrairement que la vitesse de renouvellement des ARN est la même dans le sporange et dans la préspore. Aucune information directe n'a été obtenue sur ce point. Si l'on marque des bactéries pendant la croissance et que l'on mesure ensuite la fraction de la radioactivité incorporée qui se trouve transmise dans la spore, on la trouve plus grande chez les bactéries marquées pendant la sporulation (Balassa [2] et inédit); cette différence peut cependant être attribuée soit à un renouvellement plus rapide des ARN dans la préspore, soit au fait que la partie de la population qui ne sporule pas a un renouvellement plus lent des ARN en phase stationnaire.

3° RÉGULATION QUANTITATIVE DES SYNTHÈSES MACROMOLÉCULAIRES.

— a) *Régulation par les acides aminés.* — L'effet du chloramphénicol sur la synthèse des ARN pendant la sporulation montre que les bactéries ont conservé entière leur capacité à synthétiser des ARN; il suggère fortement (par analogie avec d'autres cas où le chloramphénicol a le même effet [29]), que la vitesse de cette synthèse est contrôlée par les acides aminés. Les résultats obtenus avec des mutants précoces montrent clairement qu'il en est bien ainsi. Plusieurs observations inattendues requièrent cependant des commentaires : 1° Les acides aminés stimulent la synthèse des ARN beaucoup moins fortement si l'on n'ajoute pas de chloramphénicol; on peut supposer que la stimulation dépend de l'équilibre entre pénétration et utilisation des acides aminés. 2° Le glucose a un effet identique à celui des acides aminés, aussi bien en présence qu'en absence de chloramphénicol; cet effet est sans doute dû, en partie au moins, à l'utilisation du glucose dans la synthèse des acides aminés. La stimulation supplémentaire, donnée par le glucose en présence des acides aminés et du chloramphénicol, suggère que l'énergie est un second facteur limitant dans ces conditions. 3° La synthèse initiale des ARN en présence de chloramphénicol est linéaire, aussi bien chez les souches TO⁺ que les souches TO⁻ pendant trente minutes, ce qui indique que les changements causés par l'addition de l'antibiotique conduisent rapidement à un nouvel équilibre entre accumulation et disparition (par dégradation ou excrétion) des acides aminés.

En conclusion, les faits observés semblent donc s'expliquer au mieux si l'on admet que la vitesse de synthèse des ARN est déterminée, en phase stationnaire et pendant la sporulation, par

la concentration intracellulaire (« pool ») des acides aminés. Ce pool serait plus élevée chez les souches TO^+ que chez les mutants TO^- ; chez les premières, il augmenterait brusquement après l'addition du chloramphénicol pour atteindre une valeur permettant une synthèse presque maximale des ARN, tandis que chez les mutants TO^- , il resterait faible même en présence de l'antibiotique.

b) *Rôle d'une protéase dans la régulation.* — L'interprétation précédente implique que les mutants précoces sont incapables d'accumuler les acides aminés en présence de chloramphénicol. Puisque dans les conditions étudiées il n'y a pas de synthèse nette de protéines, le milieu de culture étant épuisé, et qu'un renouvellement des protéines a cependant lieu, les acides aminés du pool ne peuvent provenir que de la dégradation des protéines préexistantes. Cette dégradation est donc rapide chez les souches TO^+ et lente chez les mutants précoces; sa vitesse est déterminée par un événement précoce de la sporulation. L'hypothèse qui nous paraît la plus simple consiste à supposer que cet événement est la *synthèse* (ou l'activation) *d'une protéase, responsable de la dégradation intracellulaire des protéines, au début de la sporulation.* Les mutants TO^+ , ainsi que la souche sauvage, contiendraient une protéase, absente ou limitante dans les mutants TO^- .

Une relation directe entre la production d'une protéase extracellulaire et la sporulation a d'ailleurs été décrite ([11, 34] et Schaeffer, communication personnelle). Il semble cependant que cette protéase soit différente de celle qui expliquerait le renouvellement rapide des ARN et des protéines.

c) *Effet du chloramphénicol.* — L'évolution des trois paramètres qui caractérisent la synthèse des ARN en présence de chloramphénicol (vitesse initiale, « niveau de cassure » et vitesse résiduelle) a été étudiée au cours de la sporulation et au cours de la germination [8]; il semble intéressant de comparer les observations faites dans les deux cas. 1° La *vitesse de synthèse initiale*, qui mesure la capacité des bactéries à synthétiser des ARN, est très faible dans la spore germée et augmente rapidement au cours de la germination, elle diminue progressivement pendant la sporulation. Cette diminution suggère la dégradation ou l'inactivation d'un enzyme de synthèse d'ARN. 2° Si l'on admet que le « *niveau de cassure* » mesure la quantité d'une protéine, présumée ribosomale ([22] et discussion dans [8]), cette protéine serait absente de la spore et se formerait rapidement au cours de la germination. Lors de la sporulation, par contre, la quantité de cette protéine semble diminuer, peut-être à cause du renouvellement général des protéines.

d) *Coordination des réactions de synthèse et de dégradation.* — Au cours de la sporulation, la vitesse de synthèse des ARN est proportionnelle à celle des protéines, aussi bien chez les souches TO^+ que TO^- . D'autre part, quelle que soit la souche, on n'observe jamais de diminution importante de la quantité totale des ARN ou des protéines, bien qu'ils soient soumis à un renouvellement important (une dégradation importante d'ARN est observée chez d'autres espèces [28, 38, 39]). Les réactions de synthèse et de dégradation sont donc toujours proportionnelles entre elles, et toutes les quatre, deux à cinq fois plus rapides chez les souches TO^+ que chez les mutants TO^- . Cela pourrait être attribué à la formation, en plus grandes quantités, de tous les enzymes, responsables de ces réactions, chez les premières. Cependant, une interprétation qui semble plus rationnelle peut être proposée. La synthèse protéique dépend avant tout de la présence des ARN messagers, ce qui explique la proportionnalité entre ces deux synthèses. D'autre part, la vitesse égale des réactions de synthèse et des réactions de dégradation d'ARN et de protéines pourrait être attribuée à l'inhibition de ces dernières par leurs propres produits, ce qui rendrait impossible une accumulation importante des produits de dégradation. De tels mécanismes de rétro-inhibition (« feedback-control ») ont été décrits chez plusieurs enzymes de dégradation des ARN [18], ainsi que chez une protéase de *B. megaterium* [13]. L'observation que la dégradation des protéines chez *B. subtilis* (Balassa, résultat inédit), et de la β -galactosidase chez *B. megaterium* (Aubert, communication personnelle) s'arrête après addition du chloramphénicol, est en accord avec cette hypothèse. Dans le cas des ARN, il faudrait supposer d'une façon plus précise qu'il existe deux mécanismes de dégradation : l'un, portant exclusivement sur les ARN messagers, serait insensible à la rétro-inhibition et aurait même lieu en présence d'actinomycine, l'autre, agissant sur les ARN ribosomaux après l'arrêt de la croissance, serait par contre soumis à l'inhibition par les produits de dégradation. Cette hypothèse expliquerait l'apparente contradiction entre le renouvellement considérable des ARN ribosomaux pendant la sporulation (et des ARN sporaux pendant la germination [7]), et la stabilité de ces ARN après addition d'actinomycine.

La figure 16 représente schématiquement le modèle proposé pour expliquer la régulation de la vitesse de renouvellement des ARN et des protéines en absence de croissance. Dans ce modèle, un seul facteur, l'activité protéasique, détermine simultanément la vitesse de renouvellement des deux types de macromolécules. La base expérimentale de ce modèle est principalement la différence de comportement observée entre souches TO^+ et TO^- ; certains éléments du modèle, comme la relation entre le « pool » et la vitesse de synthèse des ARN, restent obscurs. Le modèle nous

semble cependant utile dans tous les cas où un renouvellement des ARN et des protéines a lieu en absence de croissance et, en particulier au cours du développement précoce des œufs fertilisés. L'apparition d'une activité protéolytique après la fécondation est bien connue (revue par Wright [37]).

Deux remarques s'imposent enfin en ce qui concerne la validité générale de ce modèle pendant la sporulation. 1° Toutes les observations ont été faites pendant la sporulation synchrone en milieu complexe épuisé. Il se peut que le métabolisme des bactéries qui sporulent pendant la croissance de la culture en milieu synthétique, ou en phase stationnaire, en limitation de la source de

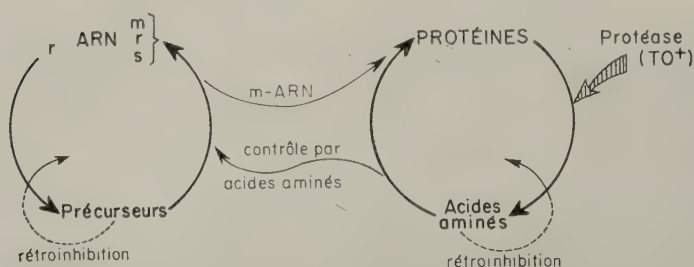


FIG. 16. — Régulation du renouvellement des ARN et des protéines.
ARN : m = messagers, r = ribosomiaux, s = solubles,

carbone ou d'azote [33] soit entièrement différent, ou du moins soumis à d'autres facteurs limitants ; l'asynchronisme de la sporulation n'en a pas permis l'étude. 2° Les expériences décrites ne caractérisent que l'ensemble sporange-préspore. Il y a tout lieu de penser que les observations faites concernent surtout le métabolisme de la préspore, mais la participation exacte des deux cellules dans le développement des structures sporales reste inconnue. 3° Nous ne connaissons pas les causes de l'absence des ribosomes de la spore.

RÉSUMÉ

L'étude quantitative de ces renouvellements conduit aux conclusions et hypothèses suivantes :

1° Un renouvellement continu des ARN et des protéines a lieu à vitesse constante tout au long de la sporulation. Les proportions dans lesquelles les trois types d'ARN sont synthétisés sont les mêmes que pendant la croissance, mais la dégradation préférentielle des ARN ribosomiaux au cours de la sporulation entraîne un enri-

chissement relatif en ARN de transfert. Cet enrichissement permet d'estimer la vitesse de renouvellement à 20 p. 100 par heure.

2° Au cours de la sporulation, la synthèse des ARN est, chez la souche sauvage, sous la dépendance des acides aminés ; elle peut être augmentée dix fois par l'addition de chloramphénicol. Le renouvellement rapide des ARN chez la souche sauvage en sporulation semble dépendre de l'apparition d'une activité protéolytique.

3° D'après la vitesse de renouvellement des ARN et sa sensibilité au chloramphénicol, on peut distinguer deux classes parmi les mutants de sporulation. Les mutants à renouvellement lent sont toujours bloqués à un stade de sporulation très précoce : la protéase présumée ne se formerait pas dans ces mutants.

Une hypothèse est finalement proposée d'après laquelle la vitesse de dégradation des protéines après l'arrêt de la croissance détermine à la fois la vitesse de renouvellement des ARN et celle des protéines. Cette dégradation serait accélérée au début de la sporulation par une protéase spécifique, inhibée par les produits de son activité. De la même façon, la dégradation des ARN ribosomiaux serait inhibée en retour par les produits de cette dégradation.

SUMMARY

TURNOVER OF RNA AND PROTEIN DURING SPORULATION.

A quantitative study of the turnover of these materials has led to the following conclusions and hypotheses :

1. Throughout sporulation a turnover of RNA and protein takes place at a constant rate. The relative rates of syntheses of the three types of RNA are the same during sporulation and during normal growth. A preferential degradation of ribosomal RNA during sporulation leads to a relative enrichment in transfer RNA. From the degree of enrichment observed it can be estimated that the RNA turnover rate is 20 p. 100 per hour.

2. In wild type *B. subtilis* RNA synthesis during sporulation depends on the presence of amino acids. This synthesis can be increased ten fold by the addition of chloramphenicol. The rapid turnover of RNA in wild type cells during sporulation seems to depend on the presence of a proteolytic activity.

3. The rate of RNA turnover and its sensibility to chloramphenicol permit the recognition of two classes of sporulation mutants. Mutants showing a slow rate of RNA turnover are always blocked at a very early stage of sporulation, and presumably the hypothetical protease is not produced in such mutants.

An hypothesis is finally proposed according to which the rate of protein degradation after the cessation of growth determines the turnover rates of both RNA and protein. It is suggested that this degradation is accelerated at the beginning of sporulation by a specific protease whose activity is subject to product inhibition. The degradation of ribosomal RNA may also be controlled by product inhibition.

★
★ ★

Ce travail a bénéficié de la collaboration technique de M^{lle} A. Malhié.

Je remercie MM. F. Gros, A. Kepes et P. Schaeffer pour leur aide au cours de la rédaction du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AUBERT (J. P.) et MILLET (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1963, **256**, 1866.
- [2] BALASSA (G.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, **76**, 410.
- [3] BALASSA (G.). Dans *Mécanismes de régulation chez les microorganismes*, 1963, 124^e Symp. du C. N. R. S., édit. C. N. R. S., 1965, 565.
- [4] BALASSA (G.). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1964, **15**, 236.
- [5] BALASSA (G.). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1964, **15**, 240.
- [6] BALASSA (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1966, **110**, n° de janvier.
- [7] BALASSA (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1965, **109**, 683.
- [8] BALASSA (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1966, **110**, n° de janvier.
- [9] BALASSA (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1966, **110**, n° de février.
- [10] BALASSA (G.), IONESCO (H.) et SCHAEFFER (P.). *C. R. Acad. Sci.*, 1963, **257**, 986.
- [11] BERNLOHR (R. W.). *J. biol. Chem.*, 1964, **239**, 538.
- [12] CAMPBELL (L. L.) and HALVORSON (H. O.) eds. *Spores III*, 1965; *Amer. Soc. Microbiol.*
- [13] CHALOUPEK (J.) and KRECKOVA (P.). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1962, **8**, 120.
- [14] DOI (R. H.) and IGARASHI (R. T.). *Nature*, 1964, **203**, 1092.
- [15] FITZ-JAMES (P. C.). *Canad. J. Microbiol.*, 1955, **1**, 502.
- [16] FITZ-JAMES (P. C.). Dans *Mécanismes de régulation chez les microorganismes*, 1963, 124^e Symp. du C. N. R. S., édit. C. N. R. S., 1965, 529.
- [17] FOSTER (J. W.) and PERRY (J. J.). *J. Bact.*, 1954, **67**, 295.
- [18] GRUNBERG-MANAGO (M.). *Progress in Biophysics and Mol. Biol.*, 1963, **13**, 175.
- [19] HALVORSON (H.). *The Bacteria*. — GUNSALUS (I. C.) and STANIER (R. Y.). Edit. 1962, **4**, 223, Acad. Press, New York.
- [20] HODSON (P.) and BECK (J.). *J. Bact.*, 1960, **79**, 661.
- [21] KJELGAARD (N. O.) and KURLAND (C. G.). *J. Mol. Biol.*, 1963, **6**, 341.
- [22] KURLAND (C. G.) and MAALØE (O.). *J. Mol. Biol.*, 1962, **4**, 193.

- [23] KURLAND (C. G.), NOMURA (M.) and WATSON (J. D.). *J. Mol. Biol.*, 1962, **4**, 388.
- [24] LEVINTHAL (C.), KEYNAN (A.) and HIGA (A.). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1962, **48**, 1631.
- [25] MANDELSTAM (J.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1963, **102**, 621.
- [26] MANDELSTAM (J.) and HALVORSON (H.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **40**, 43.
- [27] MESELSON (M.), NOMURA (M.), BRENNER (S.), DAVERN (C.) and SCHLESSINGER (D.). *J. Mol. Biol.*, 1964, **9**, 696.
- [28] MONRO (R. E.). *Biochim. J.*, 1961, **81**, 225.
- [29] NEIDHARDT (F. C.). *Progress in Nucleic Acid Res.*, 1964, **3**, 145.
- [30] NEIDHARDT (F. C.) et GROS (F.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, **25**, 513.
- [31] NOMURA (M.) and WATSON (J. D.). *J. Mol. Biol.*, 1959, **1**, 204.
- [32] SCHAEFFER (P.), IONESCO (H.), RYTER (A.) et BALASSA (G.). Dans *Mécanismes de régulation chez les microorganismes*, 1963, 124^e Symp. du C. N. R. S., édit. C. N. R. S., 1965, 553.
- [33] SCHAEFFER (P.), MILLET (J.) and AUBERT (J. P.). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1965, sous presse.
- [34] SPIZIZEN (J.). Dans [42], 125.
- [35] SPOTTS (C. R.) et SZULMAJSTER (J.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **61**, 635.
- [36] URBA (R. C.). *Biochem. J.*, 1959, **71**, 513.
- [37] WRIGHT (B. E.). *Comparative Biochemistry*. Edit., FLORKIN (M.) and MASON (H. S.), 1964, **6**, 1.
- [38] YOUNG (I. E.) and FITZ-JAMES (P. C.). *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1959, **6**, 467.
- [39] YOUNG (I. E.) and FITZ-JAMES (P. C.). *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1959, **6**, 483.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

MÉCANISME DE DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE
CHEZ LES MYXOMYCÈTES

Vu et approuvé :

Paris, le 24 juin 1965.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY.

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie
de Paris,

Jean ROCHE.

Printed in France.